

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
DER KALLIKREINE AUS
SUBMANDIBULARISDRÜSEN UND HARN
VOM SCHWEIN**

Edeltraud Müller

1972

AUS DEM
INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE UND KLINISCHE BIOCHEMIE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER KALLIKREINE AUS
SUBMANDIBULARISDRÜSEN UND HARN VOM SCHWEIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
E d e l t r a u d M ü l l e r
aus Vilsbiburg

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München



Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Fritz

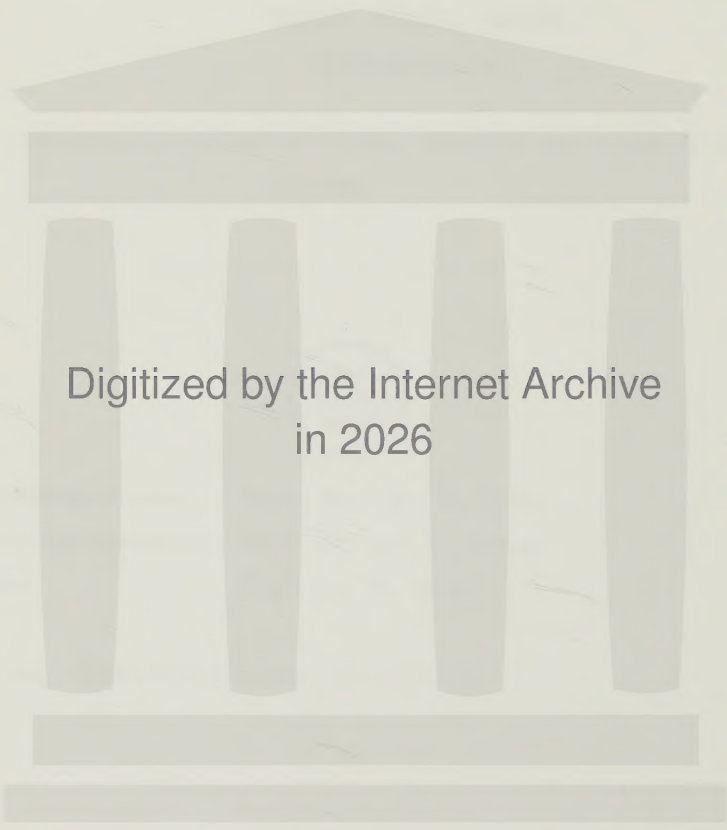
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1972

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553803_0113

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Theoretischer Teil	2
I. Vorkommen und Isolierung der Kallikreine	2
1. Pankreas-Kallikrein	2
2. Harn-Kallikrein	3
3. Submandibularis-Kallikrein	4
4. Kallikrein der Schleimhaut des Verdauungs- traktes	5
5. Kallikrein des Blutes	5
6. Andere Kininogenasen	5
II. Physikalisches und biochemisches Verhalten der Kallikreine	6
1. Beschaffenheit der Kallikreine	6
a) Löslichkeit	6
b) Elektrophoretisches Verhalten	6
c) Stabilität	7
d) Molekulargewicht	7
2. Substratspezifität der Kallikreine	7
3. Bausteinanalyse der Kallikreine	9

	Seite
4. Aktivierung, Wirkung, Hemmung und Abbau der Kallikreine	11
a) Aktivierung der Präkallikreine	11
b) Biochemischer Wirkungsmechanismus der Kallikreine	12
aa) Kininliberierung	12
bb) Esterolyse	12
c) Hemmung der Kallikreine	13
d) Abbau der Kallikreine	14
III. Pharmakologische Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems	14
1. Periphere Vasodilatation	15
2. Organdurchblutung	15
a) Herz	15
b) Lunge	16
c) Haut und Muskel	16
d) Niere, Gehirn	17
3. Kapillarpermeabilitätserhöhung	17
4. Erregung glatter Muskulatur	18
5. Schmerzerzeugung	18
IV. Physiologische Wirkungen der Kallikreine	19
1. Plasma-Kallikrein	19
2. Harn-Kallikrein	19
3. Submandibularis-Kallikrein	20
4. Pankreas-Kallikrein	21
5. Kallikrein der Milchdrüsen	21

		Seite
V.	Beteiligung der Kallikreine an patho- physiologischen Vorgängen	21
1.	Pankreatitis	21
2.	Entzündungen und Gewebsschädigungen	23
3.	Schock	24
4.	Erkrankungen des Zentralnervensystems im Zusammenhang mit dem Kallikrein-System	25
5.	Karzinoid	25
C.	Experimenteller Teil	26
I.	Definitionen	26
1.	Kallikrein-Einheiten	26
a)	Biologische Kallikrein-Einheit (KE)	26
b)	Enzym-Einheit (U)	26
2.	Inhibitor-Einheit (IU)	27
3.	Reinheitsgrad der Kallikreine	27
II.	Untersuchungsmaterial	28
III.	Methoden	29
1.	Bestimmung der Aktivität von Kallikrein	29
a)	Biologische Methode	29
b)	Enzymatische Methoden	29

	Seite
aa)	Mit Hilfe des Eppendorf-Photometers 30
bb)	Mit Hilfe des Technicon-Autoanalyzers 31
2.	Quantitative Bestimmung der Hemmung von Kallikrein 33
3.	Biuret-Reaktion zur Bestimmung des Proteingehalts in klaren Lösungen 33
4.	Quantitative Bestimmung der BAPNA-Spaltung durch Kallikrein 34
5.	Photometrische Eiweißbestimmung 34
6.	Photometrische Aktivitätsbestimmung 35
7.	Sephadex ^R -Gelfiltration 35
8.	Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose 36
9.	Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose 36
10.	Dialyse und Ultrafiltration 37
IV.	Eigene Untersuchungen und Ergebnisse 38
1.	Isolierung und Reinigung von Submandibularis-Kallikrein des Schweines 38
a)	Ausgangsmaterial 38
b)	Elution 38
c)	Erste Fraktionierung an DEAE-Cellulose im Batch-Verfahren 39
d)	Fraktionierung an Sephadex G-75 40
e)	Zweite Fraktionierung an DEAE-Cellulose 41
f)	Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose 41
g)	Fraktionierung an Sephadex G-50 42
2.	Reinigung und Isolierung von Kallikrein aus Schweineharn 50

	Seite
a)	Organentnahme und Gewinnung der Extrakte 50
b)	Acetonfällungen 50
c)	Fraktionierung an Sephadex G-75 50
d)	Erste Fraktionierung an DEAE-Cellulose 51
e)	Zweite Fraktionierung an DEAE-Cellulose 51
f)	Chromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose 51
g)	Fraktionierung an Sephadex G-50 52
3.	Charakterisierung des isolierten Submandibularis- und Harn-Kallikreins, Vergleich mit dem Pankreas-Kallikrein vom Schwein 59
a)	Hemmung von Pankreas-, Submandibularis- und Harn-Kallikrein durch den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, quantitative Untersuchungen 59
b)	Zur Hemmung von Pankreas-Kallikrein durch den Schweinesperma-Inhibitor 61
c)	Quantitativer Nachweis der BAPNA-spaltenden Aktivität von Pankreas-, Harn- und Submandibularis-Kallikrein (vergleichsweise von Humanalbumin) 61
d)	Vergleich der biologischen Aktivität von Kallikrein aus Pankreas, Harn und Submandibularisdrüsen vom Schwein 63
aa)	Kallikreine ohne Inhibitor 63
bb)	Kallikreine mit Inhibitor 65
D.	Diskussion 68
E.	Zusammenfassung 75
F.	Literaturverzeichnis 77

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
BAEE	N ^α -Benzoyl-L-arginin-äthylester
BAPNA	N ^α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid
B.Pr.	Biuret-Protein
DEAE-C	Diäthylaminoäthyl-Cellulose
DFP	Diisopropylfluorphosphat
IU	Inhibitor-Unit
mIU	Milli-Inhibitor-Unit
KE	Biologische Kallikrein-Einheit
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Hydriertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
PF/dil	Permeabilitätsfaktor, durch Verdünnen freigesetzt
PPP	Pyrophosphat-Semicarbazid-Glycin-Puffer
PPS	Pain-producing-substance
SSI	Schweinesperma-Inhibitor
TAME	Toluolsulfonyl-L-argininmethylester
TRA	Triäthanolamin-hydrochlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
U	Unit
mU	Milli-Unit

A. E I N L E I T U N G

Hochmolekulare Eiweißstoffe, welche Richtung und Geschwindigkeit von biologischen Vorgängen bestimmen und beschleunigen, werden Biokatalysatoren oder Enzyme genannt. Diese werden beim Stoffwechsel aller Organismen in den Zellen oder in Körperflüssigkeiten gebildet.

Der Chirurg Frey (26,89) stellte 1925 bei seinen Forschungen über Zusammenhänge zwischen Kreislauf und Nierenfunktion fest, daß der Harn von Säugetieren eine hochaktive blutdrucksenkende Substanz enthält, die später Kallikrein genannt wurde. Untersuchungen von Werle (2a) ergaben, daß es sich bei dieser Wirkung um die Folge eines Systems von Reaktionen, nämlich des Kallikrein-Kallidinogen-Kallidin-Systems, handelt. Die eigentlichen Wirkstoffe sind die Kinine, die durch die proteolytischen Enzyme, sog. Kininogenasen, aus den inaktiven Vorstufen, den Kininogenen, freigesetzt werden. Das Pankreas konnte später als Hauptquelle der Kininogenase "Kallikrein" identifiziert werden.

Im Serum und in Organen von Wiederkäuern fanden Kraut, Frey und Werle 1929 (85,86) Inhibitoren des Kallikreins, welche mit den Enzymen einen reversiblen inaktiven Komplex bilden.

Kallikrein aus Harn und Submandibularis-Drüsen vom Schwein rein darzustellen und die Eigenschaften der erhaltenen Produkte mit denen des Pankreas-Kallikreins zu vergleichen waren die Aufgaben dieser Arbeit. Dabei wurde auch das Hemmverhalten gegenüber dem polyvalenten Proteinase-Inhibitor aus Rinderorganen und dem Inhibitor aus Schweinesperma neben der BAPNA-Spaltung untersucht. In Studien des Blutdruckabfalls beim Hund wurde die biologische Aktivität der Enzyme untersucht.

B. THEORETISCHER TEIL

I. Vorkommen und Isolierung der Kallikreine

Kallikrein wurde bisher eingehender beim Menschen, bei Säugtieren und Vögeln untersucht. Die Konzentration dieses Fermentes pro Gramm Gewebe sinkt von den Carnivoren über Omnivoren zu den Herbivoren ab.

1. Pankreas-Kallikrein

Kallikreingehalt im Pankreas verschiedener Spezies in KE/g

Frishgewebe (1):

Mensch	25
Rind	20
Schwein	20
Hund	20 - 100

Im Pankreas kommt Kallikrein nur in der inaktiven Vorstufe, genannt Präkallikrein (2) vor. Im azinären Teil der Drüsen gebildet (3) findet man nach grober Zentrifugation von Pankreashomogenat des Schweines 4/5 des Präkallikreins in Mikrosomen und Cytoplasma, den Rest in Mitochondrienfraktionen (4). Unter physiologischen Bedingungen wird das Enzym im Duodenum aktiviert (2). Unter mehreren Verfahren zur Isolierung haben sich vor allem die Methode nach Werle und Trautschold (5) bewährt, in der das Homogenat nach 72stündiger Autolyse bei 37°C über Eisenhydroxyd und wiederholte Acetonfällung bzw. DEAE-Fraktionierung und Sephadex G-25-Fraktionierung gereinigt wurde, sowie die Verfahren nach Habermann (6,7) und nach Fritz und Werle (8,73), wobei Hydroxylapatit anstelle von DEAE-Cellulose verwendet wurde. Moriya und Webster isolierten Kallikrein aus menschlichem Pankreas (9).

2. Harnkallikrein

Harnkallikrein wird wahrscheinlich in der Niere gebildet. So scheiden Patienten mit akuter Pankreatitis, bei der es zu ei-

nem Übertritt von Pankreaskallikrein ins Blut kommt, nicht vermehrt Kallikrein aus, was für die Zuführung der Organ-kallikreine zur Niere sprechen würde.

Durchschnittliche Konzentration von Kallikrein im Harn (10, 19):

Mensch	0,2 KE/ml Harn
Schwein	2,0
Rind	0,1
Hund	1,5

Frey und Kraut (1926) und Kraut und Schweitzer (1949) (11) erreichten bei der Isolierung des Enzyms aus Menschenharn den Reinheitsgrad von 2 μ g Protein/KE. Kallikrein aus dem Harn von Schweinen wurde von Werle und Trautschold, sowie Werle, Schmal und Roder (12) durch Acetonfällung, Adsorption an DEAE-Cellulose, mehrfache Säulenchromatographie an Sephadex G-75 und zweimalige Säulenelektrophorese gewonnen.

3. Submandibularis-Kallikrein

In diesen Drüsen kommt nach Werle und von Roden kein Präkallikrein, sondern nur aktives Kallikrein vor (13).

Kallikreingehalt der Speicheldrüsen verschiedener Spezies (14, 20):

Mensch	2 KE/g Drüsengewebe
Schwein	60

Rind 45 KE/g Drüsengewebe

Ratte 4000

Werle und Trautschold (5), neben Roder, Schmal (12) stellten hochgereinigtes Kallikrein dar. Isolierungsversuche aus menschlichem Speichel nach Werle (13), Moriya (15) und aus Schlangengift nach Suzuki (16) sind im Gange.

4. Kallikrein der Schleimhaut des Verdauungstraktes

Auch Magen- und Darmschleimhaut enthalten nach Werle (17) 1 - 15 KE/g Gewebe, hauptsächlich als Präkallikrein. Dabei nimmt die Konzentration des Kallikreins bei den Spezies in der Reihenfolge Herbivoren, Omnivoren, Carnivoren signifikant zu.

5. Kallikrein des Blutes

Im Plasma läßt sich Präkallikrein nicht, wie ursprünglich angenommen, der Kallikrein-Inhibitor-Komplex feststellen. Werle, Forell und Maier setzten aus Rattenserum rund 5 KE/ml frei (18). Den höchsten Gehalt weist Schweineserum mit 10 KE/ml auf (5). Die Isolierung erfolgt über Kaseinfällung, Lösung in Ammoniak und Fraktionierung über Sephadex G-100.

6. Andere Kininogenasen

In der Lunge soll nach Werle und Maier (21) aktives und inaktives Kallikrein zu finden sein. Im Gehirn, im peripheren Ner-

vensystem (22), im Liquor cerebrospinalis (23), in den accessorischen Geschlechtsdrüsen vom Meerschweinchen (24), im Schweiß und in Tränendrüsen ließen sich Kininogenasen feststellen.

II. Physikalisches und biochemisches Verhalten der Kallikreine

1. Beschaffenheit der Kallikreine

a) Löslichkeit

Kallikrein ist in wässrigen Lösungen, wie in wässrigem Alkohol und Aceton, nicht dagegen in organischen Lösungsmitteln, wie Äther und Benzol löslich. In alkohol- und acetonhaltigen Lösungen wird es langsam denaturiert.

b) Elektrophoretisches Verhalten

Durch Kataphorese nach Theorell bestimmte Werle (25) für teilweise gereinigtes Kallikrein verschiedener Art einen isoelektrischen Punkt zwischen 4,0 und 4,3. Später erhielten Werle und Trautschold durch Membranelektrophorese wiederum Werte von 4,4 bzw. 4,0 (5). Die Wanderungsgeschwindigkeit bei pH 8,0 nimmt vom Pankreas-Kallikrein über Submandibularis- und Harn-Kallikrein zum Serum-Kallikrein ab. Letzteres wandert zwischen β - und γ -Globulinen (5).

c) Stabilität

Je reiner das Produkt ist, desto eher wird es bei höheren Temperaturen und bei pH-Werten > 9,0 denaturiert. Serum-Kallikrein ist hier am empfindlichsten.

d) Molekulargewicht

In den ersten Versuchen mit Kallikrein stellte man fest, daß es sich um eine Substanz mit dem Molekulargewicht zwischen 30 000 und 50 000 handeln müsse (26). Mit Hilfe der Bausteinanalyse und Sephadex-Gelfiltration erhielten Fritz, Traut-schold, Werle (27) Werte zwischen 33 000 und 35 000.

2. Substratspezifität der Kallikreine

Die Kallikreine, denen die Spaltung von Kininogenen gemeinsam ist, unterscheiden sich im Angriffspunkt in der Aminosäurenkette. Pankreas-, Submandibularis- und Harn-Kallikrein trennen zwischen Methionin und Lysin, Plasma-Kallikrein dagegen greift zwischen Lysin und Arginin an (s. Abb.1) (72).

Die esterolytische Aktivität auf BAEE zeigt eine abnehmende Geschwindigkeit von Plasma- zu Pankreas-, Submandibularis- bis Harn-Kallikrein (5). Plasma-Kallikrein zeigt ebenso gegenüber Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) eine wesentlich stärkere enzymatische Wirkung als Submandibularis- oder Pankreas-Kallikrein (5).

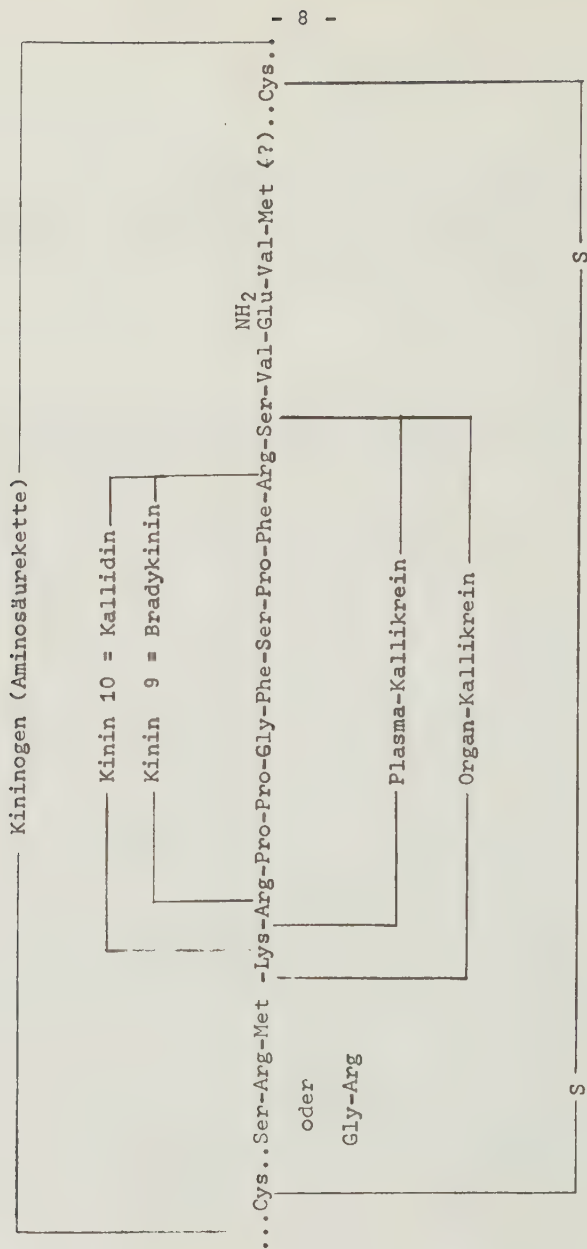


Abb.1: Bau von Kininogen und Kininen (72)

3. Bausteinanalyse der Kallikreine

Pankreas-Kallikrein hat nach Fritz, Eckert und Werle (8) folgende Zusammensetzung: 288 Aminosäuren, 6 - 7 Glucosaminmoleküle, 7 Hexosemoleküle. Roder (12) führt in seiner Dissertation das Ergebnis für Submandibularis- und Harn-Kallikrein auf.

Tab.1: Bausteinanalyse der Kallikreine aus Pankreas, Harn und Gl. submandibularis vom Schwein (Angaben in Mol Aminosäuren/Mol Kallikrein)

	Kallikrein aus	Pankreas	Harn	Submandi- bularis
	nach lit.cit.	(8)	(12)	(12)
Lys		13	16	16
His		10	10	10
Arg		4	8	4
Asp		33	31	32
Thr		18	21	18
Ser		17	20	23
Glu		28	29	25
Pro		20	27	21
Gly		27	24	23
Ala		16	16	11
Cys 1/2		10	10	8
Val		13	15	22
Met		5	4	2
Ile		14	12	14
Leu		24	24	44
Tyr		9	8	5
Phe		13	11	6
Try		9	8	5
Summe		288	294	289
Glucosamin		6	10	6
Galactosamin		0	5	3
Hexosen		7	10	0
MG		33300	36300	32800

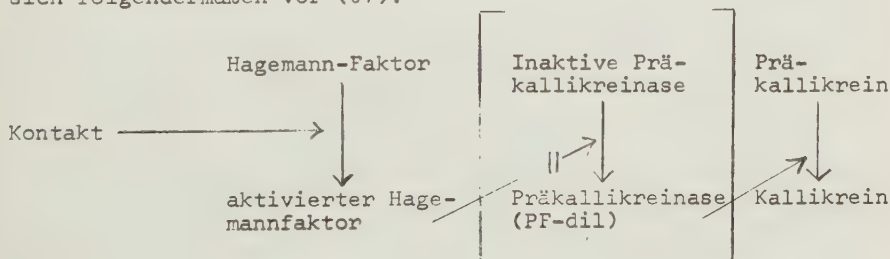
Diisopropylfluorophosphat (DFP) reagiert nur mit dem aktiven Serinrest der Serinproteinasen. Da durch diese Substanz die

enzymatische Aktivität der Kallikreine aufgehoben werden kann, führt man dies ebenfalls auf eine Blockierung der OH-Gruppe des Serins im aktiven Zentrum des Kallikreins zurück (29). Als aminoendständige Aminosäure fand Werle (5) Alanin, Moriya Phenylalanin. Als carboxyl-endständig wird ebenfalls Alanin nach Moriya bezeichnet (30).

4. Aktivierung, Wirkung, Hemmung und Abbau der Kallikreine

a) Aktivierung der Präkallikreine

Dieser proteolytische Vorgang ist noch nicht endgültig geklärt. Vermutlich handelt es sich um eine Hydrolyse einer Peptidbindung unter Abspaltung eines Polypeptids und Änderung der Konformation wie im Falle des Trypsins oder, durch eine Beseitigung einer sterischen Hinderung, um eine Freilegung des aktiven Zentrums. Trypsin könnte bei der Kallikreinfreisetzung im Pankreas der entscheidende Faktor sein (36). Den Mechanismus der Aktivierung von menschlichem Plasma-Kallikrein stellt man sich folgendermaßen vor (37):



Die Präkallikreine der Niere und der Darmschleimhaut werden wohl auch durch Trypsin aktiviert, wie durch in vitro-Versuche gezeigt werden konnte (22).

b) Biochemischer Wirkungsmechanismus der Kallikreine

aa) Kininliberierung

Ursprünglich machte man das Kallikrein selbst für die Blutdruckwirksamkeit verantwortlich. Doch bald stellte sich heraus, daß ein enzymatischer Mechanismus dabei abrollt. Das Substrat des Kallikreins ist das in der α_2 -Globulin-Fraktion wandernde Plasmaglobulin Kallidinogen (31). Das Kinin, welches durch Serum-Kallikrein, Trypsin oder bestimmte Schlangengifte entsteht, Bradykinin genannt, unterscheidet sich vom Kallidin nur durch das Fehlen der Aminosäure Lysin (28):

Bradykinin H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH

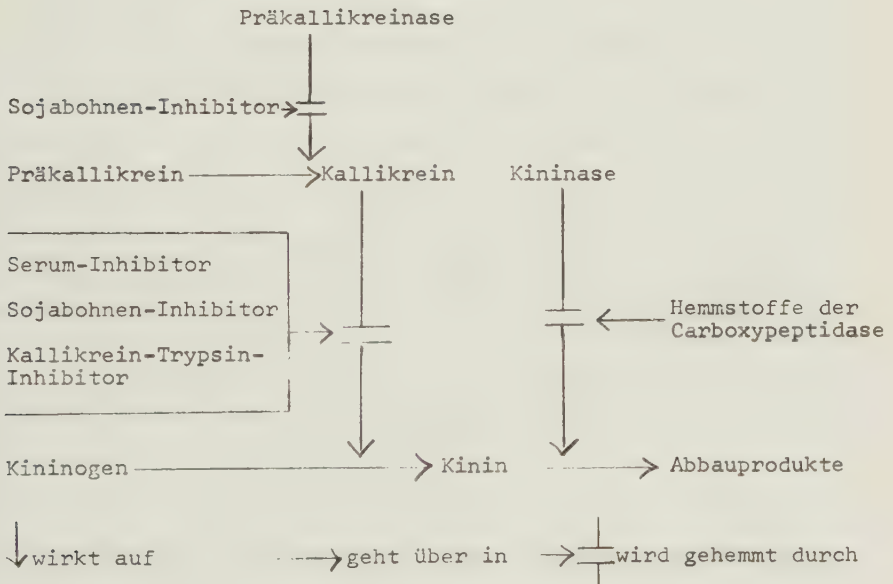
Kallidin H-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH

bb) Esterolyse

Kallikreine können verschiedene Ester spalten, wie Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE), Benzoyl-L-argininmethylester und Toluolsulfonyl-L-argininmethylester (TAME) (32). Daneben spaltet Pankreas-Kallikrein auch einige synthetische Tyrosin- und Tryptophan-Ester (33).

c) Hemmung der Kallikreine

Niedermolekulare Substanzen, wie DFP, die das aktive Zentrum blockieren (29), natürliche Inhibitoren, Kallikrein-Antikörper und kompetitiv hemmende Substrate beeinflussen die Aktivität der Kallikreine. Folgende Abbildung möge schematisch die wichtigsten Inhibitoren und deren Angriffspunkte beleuchten (14):



Das Hemmspektrum der wichtigsten Hemmstoffe für Kallikrein zeigt die verschiedene Spezifität (14). Interessant ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die Habermann am Kaninchen gegen Schweine-

pankreas-Kallikrein (34), Back gegen Harn-Kallikrein und Pankreas-Kallikrein vom Menschen studierte (35). Werle und Vogel immunisierten Kaninchen mit reinem Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein vom Schwein. Diese Enzyme erweisen sich dabei nicht nur organspezifisch, sondern auch ordnungsspezifisch, das heißt speziesunterschiedlich. Sowohl die Hemmung durch Inhibitoren als auch die Antigen-Antikörper-Komplex-Bildung ist reversibel.

Als kompetitive Hemmung sei die Wirkung der synthetischen Substrate der Kallikreine bei der Freisetzung von Kinin hervorgehoben (60).

d) Abbau der Kallikreine

Durch Trypsin, Pepsin, Papain und Schimmelpilzproteinase wird Plasma-Kallikrein, Pankreas-Kallikrein dagegen nur durch Pepsin abgebaut. Gegen Oxydationsmittel wie H_2O_2 und J_2 reagieren diese Enzyme sehr empfindlich (30). Säuren, Basen, UV-Strahlen und vor allem Hitze über $56^{\circ}C$ zerstören Kallikreine.

III. Pharmakologische Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems

Kinine sind die eigentlichen Wirkstoffe, welche durch die enzymatische Aktivität der Kallikreine freigesetzt werden. Zwischen diesen beiden Substanzen bestehen zwar keine qualitati-

ven Unterschiede in ihrer pharmakologischen Wirkung, doch stimmen sie, quantitativ betrachtet, nicht überein. An isolierten Testorganen ist Kallikrein unwirksam, da das Substrat, nämlich Kininogen, fehlt.

1. Periphere Vasodilatation

Früher war die einzige quantitative Methode zur Kallikreinbestimmung die Messung der blutdrucksenkenden Wirkung eines Präparates, verglichen mit einem Standardpräparat. Die nach intravenöser Injektion von Kallikrein gebildeten Kinine greifen an den Metarteriolen und am proximalen Teil der Kapillaren an. Die Kürze der Wirkung, etwa zehn Minuten, ist eine Folge der Geschwindigkeit, mit der die Kinine durch Kininasen des Blutplasmas und der Gewebe abgebaut werden. Auch die sympathische Gegenregulation trägt zum Verschwinden dieses Blutdruckabfalls bei. Die nach Absinken des systolischen und diastolischen Druckes einsetzende Gegenmaßnahme, Zunahme der Herzfrequenz und des Schlagvolumens (38), bewirkt eine Normalisierung.

2. Organdurchblutung

a) Herz

Signifikant beeinflussen Kallikreine und Kinine die Koronargefäße. Aufgrund von Messungen mittels Herzkatheters fanden Lochner und Parrat (39) bei Hunden, daß Infusionen von Kallidin oder

Bradykinin, direkt in die art. coronaria sinistra, einen Anstieg des Koronarflusses, eine Erhöhung der Sauerstoffspannung im Blut des sinus coronarius und eine Steigerung des Koronardurchflusses pro Herzschlag zur Folge haben. Der Kinineffekt ist auch nach Blockierung der β -Rezeptoren unverändert. Während die peripheren Gefäße spezifische Kininrezeptoren haben, reagieren die Koronarien mit unspezifischen Rezeptoren auch auf modifizierte Kininmoleküle.

b) Lunge

Durch i.v. Kallikreininjektion steigt der Druck in der art. pulmonalis ein wenig, während gleichzeitig der Druck in der art. carotis absinkt (Frey und Kraut). Eine geringe Vergrößerung des Lungenvolumens ist die Folge.

c) Haut und Muskel

Durch die induzierte Gefäßerweiterung mit Kallikrein wird die Haut mehr durchblutet. Dies läßt sich durch Messung der Hauttemperatur deutlich nach vorheriger Senkung demonstrieren (41). Die Vermehrung der Durchblutung der Haut durch Kallikrein findet in der plastischen Chirurgie Anwendung. Die Steigerung der Muskeldurchblutung kann nach i.v. Injektion von 10 KE Kallikrein bis 100% betragen. Arteriographisch kann dies sichtbar gemacht werden (Madlener, Löweneck). Bei Durchblutungsstörungen, vor allem der Extremitäten, wird Kallikrein daher therapeutisch angewandt.

d) Niere, Gehirn

Parallel zur Blutdrucksenkung kann ein Absinken des Nierenvolumens nach Kallikreinzufuhr beobachtet werden (43). Bei nieresunden, nicht narkotisierten Menschen kann nach dem Abklingen dieser Wirkung eine dosisabhängige Steigerung der Diurese beobachtet werden (44). Dabei werden die Natrium-, Chlor- und Kaliumausscheidung und die Clearance von freiem Wasser erhöht. Es findet wahrscheinlich eine Hemmung der tubulären Rückresorption statt.

Auch die Gehirndurchblutung reagiert auf Kallikrein positiv. Die direkte Beeinflussung der Hirngefäße ist mit der Histaminwirkung zu vergleichen. Eine Erweiterung der intracranialen Gefäße wird durch den beobachteten Anstieg des Liquordruckes gedeutet (Werle).

3. Kapillarpermeabilitätserhöhung

Auch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität wurde als Wirkung des durch Kallikrein freigesetzten Kallidins erkannt. Quantitativ läßt sich dies am Austritt von zuvor i.v. verabreichten Farbstoffen an der Hautstelle zeigen (45). Die Kapillaren werden dabei nicht geschädigt. Auch eine Leukozytenmigration zur Injektionsstelle ließ sich nachweisen (46).

4. Erregung glatter Muskulatur

Am empfindlichen isolierten Rattenuterus läßt sich die kontrahierende Wirkung von Kinin, das aus dem Kininogen der interstitiellen Gewebsflüssigkeit entsteht, demonstrieren. In vivo fehlt diese Wirkung oft; dies spricht für einen raschen Abbau des Kinins (47). Auf die Bronchialmuskulatur wirken Kinine in situ und in vitro konstriktorisch. Beim Meerschweinchen läßt sich mit geringen Dosen ein Bronchospasmus erzeugen (48). Der isolierte Hundedünndarm antwortet auf 0,03 KE Kallikrein mit starken, langanhaltenden Kontraktionen (49). Das isolierte Meerschweinchenileum wird oft zur quantitativen Kininbestimmung herangezogen.

5. Schmerzerzeugung

Bei subcutaner Kallikrein-Injektion kommt eine Schmerzreaktion zustande, die auf einer Reizung der Nocirezeptoren beruht. Armstrong und Mitarbeiter (50) schrieben diese Reaktion der Freisetzung einer "pain producing substance" (PPS) zu. Auf die Basis einer Kantharidenblase des Menschen aufgebracht, lösen Kinine schon bei stärkster Verdünnung einen Schmerz aus. Da die Entstehung des PPS durch Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor zu verhindern ist, wird wohl Plasma-Kallikrein daran beteiligt sein.

IV. Physiologische Wirkungen der Kallikreine

1. Plasma-Kallikrein

Beweisend für physiologische Funktionen von Kininen ist das Erscheinen freier Kinine im Blutplasma bei definierten physiologischen Funktionsabläufen. Als Bildungsort des Kallikreinogens ist die Leber zu betrachten. Zur Aktivierung des Plasma-Kallikreins trägt eine Anhäufung saurer Metabolite bei. So kann man nach längerer Muskeltätigkeit verstärkt Kallikrein nachweisen. Eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems beim Zustandekommen der reaktiven Hyperämie wird von Frey angenommen. Ebenso diskutieren Periti und Gasparri (51) die Anwesenheit von Kinin bei der funktionellen Hyperämie in Zusammenhang mit Uteruskontraktionen bei den Eröffnungs- und Austreibungswehen. Gegen Ende der Schwangerschaft liegt der Plasma-Kininogen-Spiegel über der Norm. Nach Injektion von Padutin^R wurde dosisabhängig eine Zunahme des Gewichtes verschiedener Organe, wie Geschlechts-, Schilddrüsen und Nebennieren festgestellt. Da nach Hypophysektomie diese Wirkungen ausblieben, wird gefolgert, daß Kallikrein in die Gonadotropinproduktion fördert. Auch ACTH und TSH können vermehrt abgegeben werden (52).

2. Harn-Kallikrein

Pro Tag erscheint im Harn von gesunden Menschen eine gewisse

Menge von freien Kininen (10 - 30 µg). Diese Kinine werden in der Niere aus Kininogen durch eine Kininogenase, wahrscheinlich Kallikrein, gebildet. Für eine Kallikreinfunktion in diesem Organ sprechen auch Beobachtungen nach Transplantationen. Ehe andere Zeichen einer beginnenden Niereninsuffizienz auftreten, nimmt die Ausscheidung von Harnkallikrein durch transplantierte Nieren von Hunden ab. Auch durch die Art der Nahrung wird die Menge der Kallikreinausscheidung gesteuert. Die Proteinzufuhr spielt dabei eine große Rolle (53,54). Hormonelle Einflüsse, wie ein Absinken der Ausscheidung nach Adrenalektomie, Hypophysektomie und Anstieg derselben nach Thyroxingaben sind zu beachten (55).

3. Submandibularis-Kallikrein

Die physiologische Funktion dieses Kallikreins wird im Zusammenhang mit der für die Glandula submandibularis charakteristischen atropinresistenten Gefäßerweiterung nach Reizung der Chorda tympani, die während der Sekretion auftritt, gesehen. Hilton und Lewis nehmen an, daß es sich hier um ein allgemeines Prinzip zur Regelung der örtlichen Durchblutung exkretorischer Drüsen handelt (56). Eine andere Funktion sehen Kroeger und Krivoy in einer Permeabilitätserhöhung für Substanzen wie Glucose und Saccharose (57). Durch Kostvariation läßt sich keine Beeinflussung des Kallikreingehalts feststellen.

4. Pankreas-Kallikrein

Nach Ei- und Fettverfütterung sinkt der Präkallikreinwert des Pankreas, nach Fleischezufuhr steigt er an (54). Hilton und Jones nehmen an, daß die funktionelle Gefäßweiterung im Pankreas durch das Kallikrein-Kallidin-System vermittelt wird (58).

5. Kallikrein der Milchdrüsen

Colostrum von Säugetieren und von Menschen enthält ein Kininogen, aus dem das Speichelkallikrein das Colostro-Kinin liberiert. Es wird vermutet, daß Colostro-Kinin die Resorption der Immunkörper im kindlichen Verdauungstrakt fördert (59).

V. Beteiligung der Kallikreine an pathophysiologischen Vorgängen

1. Pankreatitis

Beim Zustandekommen der akuten hämorrhagischen Pankreatitis spielt das Kininogenase-Kinin-System zweifelsohne eine große Rolle. Bei der Enzymentgleisung, d.h. Blutdiastase- und Lipaseanstieg, die für diese Krankheit typisch ist, dringt aktives Kallikrein in das Interstitium des Gewebes und in die Blutbahn. Dort setzt es Kallidin frei. Die Folge ist eine Permeabilitätssteigerung der Kapillaren und eine Ödembildung (61). Es kommt zu einer Aktivierung des aus den geschädigten Kapillaren ausge-

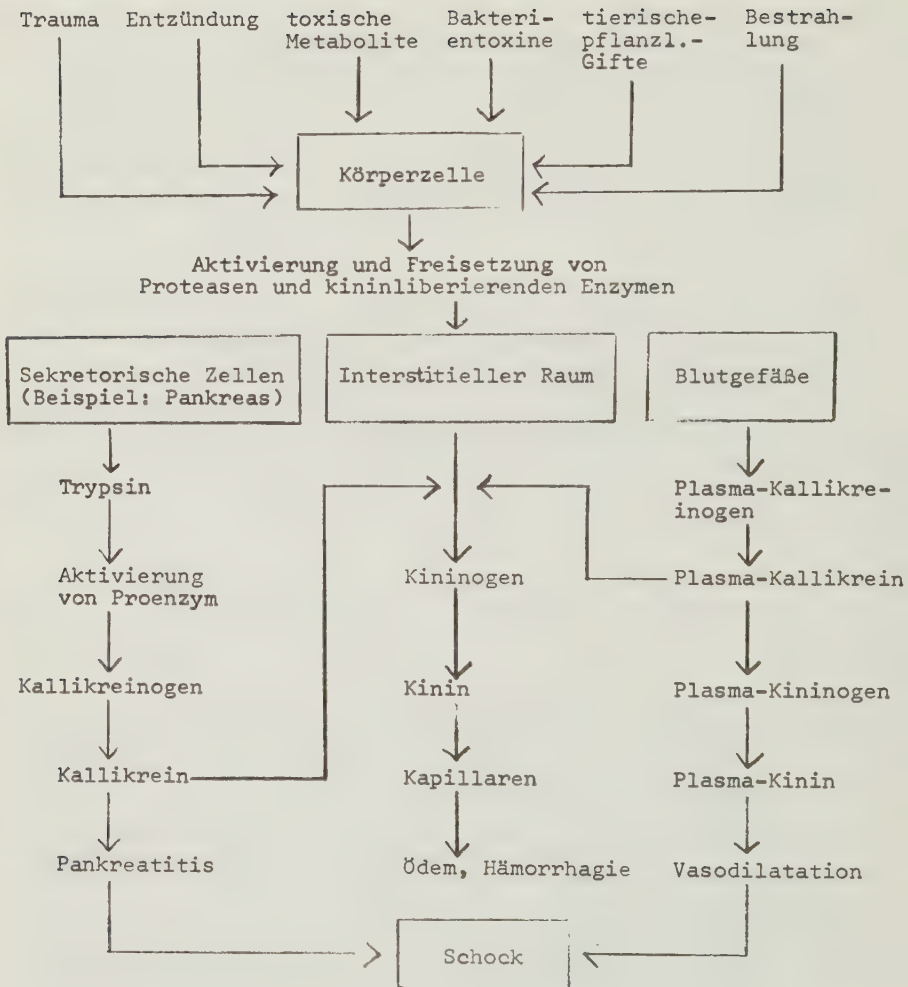


Abb.2: Übersicht über die Freisetzung von Kininen unter pathologischen Bedingungen (72)

tretenen Plasma-Präkallikreins. Dieses liberiert zusammen mit dem aktiven Pankreas-Kallikrein die Kinine. Meyer und Werle konnten bei experimenteller Pankreatitis am Hund das Absinken des Substrats des Kininogens nachweisen (62). Mit der Ausbildung von kleinen und großen Nekrosen gelangen Kininogenasen und Fermente, die Plasma-Präkallikrein aktivieren, in die Blutbahn und führen zu einer generalisierten Kininbildung, die sich als Kreislaufschock äußert. Die Steigerung der proteolytischen Aktivität im Gewebe kann durch Trypsin-Inhibitoren, wie Trasylol^R oder Sojabohnen-Inhibitor gehemmt werden.

2. Beteiligung bei Entzündungen und Gewebsschädigungen

Kinine verursachen die typischen Kriterien einer Entzündung - rubor, dolor, calor und tumor. Die Kininanreicherung wird durch das Absinken des pH-Wertes in entzündeten Geweben begünstigt (63). Die Tatsache, daß Leukozyten Kininogenasen und Kininasen enthalten, ist für die Mitwirkung von Kininen am entzündlichen Vorgang von Bedeutung. Doch auch Kininasen kommen in Blutzellen vor, die die Anhäufung von Kininen im Blutplasma schließlich stoppen (64). Das Freiwerden dieser Kinine setzt aber zunächst eine aktive Kininogenase im Blutplasma oder im Interstitium voraus. Das Kallikreinogen bzw. Plasma-Präkallikrein kann durch eine Senkung des pH-Wertes oder durch Anreicherung des Hagemann-Faktors in aktives Plasma-Kallikrein übergeführt werden. Rocha

e Silva wies nach, daß neben Histamin und Serotonin bei Verbürhungen oder auch nur beim Erhitzen von Hautpartien auf 45°C in der Durchströmungsflüssigkeit eine kininartige Substanz frei wird. Durch die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung durch Bradykinin und Kallidin wird im geschädigten Gewebe die Energiegewinnung gestört (65). Dadurch wird der Gewebszerfall beschleunigt. Bei der Gicht werden infolge Reizung der Synovia durch Uratkristalle Kinine freigesetzt, die auch die Ursache der Schmerzen sein sollen. Armstrong und Mitarbeiter wiesen in der Synovialflüssigkeit entzündeter Gewebe verschiedener Ursachen einen erhöhten Kiningehalt nach (66).

Bei einem Patienten mit angioneurotischem Ödem zeigten Webster und Mitarbeiter das Fehlen von Kallikrein-Inaktivator, C'1-Esterase und PF/dil im Blutplasma (67). Dabei soll im Anfall aktives Kallikrein entstehen, das nicht durch den beim gesunden Menschen vorhandenen Hemmstoff inaktiviert werden kann.

3. Beteiligung am Schock

Die Abnahme der Konzentration der Kininvorstufe im Serum nach eingetretenem Schock wird als indirekter Beweis für die Beteiligung des Kallikreins an diesem pathologischen Vorgang angenommen (68). Webster und Clark (69) führten die akute Blutdrucksenkung beim Endotoxin- und hämorrhagischen Schock auf

eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems zurück. Nach Vorbehandlung mit Trasylol^R ist die Mortalität von Ratten, Hunden, Meerschweinchen beim Verbrennungsschock, traumatischen und anaphylaktischen Schock geringer.

4. Erkrankungen des Zentralnervensystems im Zusammenhang mit dem Kallikreinsystem

An der Entstehung der Symptome bei subarachnoidalen und zerebralen Blutungen wie Kopfschmerz, Hirnödem und meningeale Reizerscheinungen sollen nach Sicuteri Kinine beteiligt sein. Ihre pharmakologischen Wirkungen, wie Schmerzerzeugung, Gefäßerweiterung, Permeabilitätserhöhung, kurz entzündungsfördernde Eigenschaften sprechen dafür. Im Liquor bei Subarachnoidalblutungen fand Sicuteri vermehrt Kinine in freier Form (70). Als freisetzender Faktor wird eine intrazelluläre Proteinase diskutiert.

5. Karzinoid

In Karzinoidmetastasen, aus Leber von Patienten entnommen, fanden Oates und Mitarbeiter (70) aktives Kallikrein. Willkürliche Abgabe dieser Substanz in die interstitielle Flüssigkeit und in das Blutplasma bewirkt eine Kallidinfreisetzung.

Während des "flush" bei Karzinoidpatienten fand Oates vermehrt Kallidin im Lebervenenblut. Auch Werle und Mitarbeiter wiesen in einer Netzmetastase aktives Organkallikrein nach (71). Wei-

tere pathologische Zustände wie Infektionen verschiedener Art, chronische Nephritis, nephrotisches Syndrom gehen mit einer Senkung des Kininogenspiegels einher, was indirekt auf eine Beteiligung von Kallikrein hinweist.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Definitionen

1. Kallikrein-Einheit

a) Biologische Kallikrein-Einheit

Eine biologische Kallikrein-Einheit (1 KE) ist nach Frey, Kraut, Werle (26) diejenige Menge Kallikrein, die bei i.v. Injektion am Carotidruck eines narkotisierten Hundes dieselbe Senkung auslöst wie 5 ml Harn vom gesunden Menschen aus einer Sammelprobe von mindestens 50 l, die 24 h gegen fließendes Wasser dialysiert worden war. (In der anglo-amerikanischen Literatur wird diese Einheit auch als Frey-Unit = FU bezeichnet)

b) Enzym-Einheit

Eine Enzym-Einheit = Unit (1 U) ist diejenige Menge Kallikrein,

die ein Mikromol (μMol) Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE) pro Minute unter Standardbedingungen umsetzt (5,27). Der 1000. Teil dieser Einheit ist ein Milli-Unit (1 mU).

Nach Werle (5,26) besteht bei Pankreas-Kallikrein folgender Umrechnungsfaktor zwischen biologischer und enzymatischer Einheit:

$$1 \text{ U} \hat{=} 10 \text{ KE}$$

2. Inhibitor-Einheit

Eine Inhibitor-Einheit = Inhibitor Unit (1 IU) des Kallikrein-Trypsin-Hemmstoffes aus Rinderorganen ist diejenige Inhibitor-menge, die unter Standardbedingungen (15 min Vorinkubation beim pH-Optimum des Enzyms und bei Raumtemperatur) die Aktivität von 2 U Kallikrein zu 50% hemmt bzw. den Substratumsatz bei Standardbedingungen um $1 \mu\text{Mol/min}$ reduziert (5,27,74). Der 1000. Teil dieser Einheit ist eine Inhibitor-Milli-Unit (1 mIU).

3. Reinheitsgrad der Kallikreine

Der Reinheitsgrad der Kallikreine ist definiert als Zahl der Enzymeinheiten (U) pro mg Protein (= U/mg). Diese Definition wird im internationalen Schrifttum gebraucht.

II. Untersuchungsmaterial

Betrachtet man den Kallikreingehalt der im ersten Teil der Arbeit aufgeführten Organe verschiedener Spezies, so eignet sich zur Isolierung dieses Enzyms in erster Linie die Bauchspeicheldrüse, neben der Mundspeicheldrüse und dem Harn. Das Schwein weist dabei regelmäßig einen hohen Sekretionswert auf. Der Mensch produziert zwar etwas mehr an Pankreas-Kallikrein und die Ratte übertrifft mit 4000 KE/g Drüsengewebe die Sekretion der glandula submandibularis des Schweines mit 60 KE/g Gewebe. Um jedoch einen Vergleich der Organ-Kallikreine einer Spezies zu erhalten, isolierten wir Speicheldrüsen- und Harn-Kallikrein des Schweines. Pankreas-Kallikrein und -Präkallikrein dieses Tieres wurden von Werle und Trautschold (5,26), in den letzten Jahren vor allem von Fritz (8,73,88) und Fiedler (87) angereichert und charakterisiert. Deshalb wurde für diese Arbeit die Isolierung der Kallikreine aus Schweine-Submandibularisdrüsen und -Harn gewählt.

III. Methoden

1. Bestimmung der Aktivität von Kallikrein

a) Biologische Methode

Einem künstlich beatmeten, unter Pernocton^R- oder Barbital^R-Narkose stehenden Hund von 5 - 10 kg Gewicht wird die Testsubstanz in die vena saphena gespritzt. Ein Ludwig'sches Quecksilbermanometer zeigt über die Carotis den Blutdruckabfall nach Injektion an. Der Kunststoffschlauch, mit dem diese Verbindung hergestellt wird, ist mit 2 - 3 Ampullen Vetren^R (je 200 I.E. Heparin, Promonta) gefüllt, um eine Blutgerinnung auszuschalten. Die untere Grenze der Ansprechbarkeit liegt bei 0,005 - 0,02 KE/kg Tier. Man spritzt jeweils zwischen 0,05 und 0,15 KE. An jede Injektion von Kallikrein schließen sich 1 - 2 ml physiologische Kochsalzlösung an. Zwischen den einzelnen Proben ist eine Pause von 5 min erforderlich. Mit der Blutdruckwirkung eines Standardpräparates (z.B. Padutin^R) kann der durch die Testsubstanz verursachte Blutdruckabfall verglichen werden. Gleiche Blutdrucksenkung beider Präparate läßt eine Aussage über den Umrechnungsfaktor ($1 \text{ U} \hat{=} x \text{ KE}$) für die Test-Kallikreine zu, wenn für Pankreas die Gleichung $1 \text{ U} \hat{=} 10 \text{ KE}$ aufgestellt wird (73).

b) Enzymatische Methoden

aa) Mit Hilfe des Eppendorf-Photometers

Prinzip: Diese Methode beruht auf der esterolytischen Wirkung der Kallikreine, nach folgender Reaktion:



Der freigesetzte Äthylalkohol kann photometrisch über ein zweites Enzym, Alkoholdehydrogenase (ADH), welches Wasserstoff überträgt, bestimmt werden. Das beigegefügte Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH hydriert. Die dadurch hervorgerufene Zunahme der Lichtabsorption bei 366 nm kann gemessen werden. Vorteil: Kallikrein-Lösungen mit hohem Proteingehalt oder anderen verunreinigenden Substanzen können gut verwendet werden. Nachteil: Durch Anwesenheit von Alkohol in der Laborluft wird der Test erheblich beeinflusst.

Substanzen:

1. Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD), (Boehringer, Mannheim), 20 mg NAD/ml aqu. bidest. im Eisbad
2. Pyrophosphat-Semicarbazid-Glycin-Puffer (PPP), pH 8,7 (15,2 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ + 4,1 g Semicarbazid + 0,9 g Glycin in aqu. bidest. lösen, mit 2 N NaOH auf pH 8,7 einstellen und auf 500 ml auffüllen)
3. Alkoholdehydrogenase (ADH), (Boehringer, Mannheim), 30 mg ADH/ml aqu. bidest., im Eisbad

4. Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE), (Mann Research Laboratories), 3×10^{-3} M: 1,0 mg BAEE x HCl/ml aqu. bidest., im Eisbad

Durchführung: Nacheinander werden in Küvetten der Schichtdicke 1 cm je 0,1 ml NAD, 2,28 ml Puffer (2,38 ml Puffer in die Vergleichsküvette), 0,5 ml BAEE und 0,02 ml ADH pipettiert. Die Mischung wird 5 min bei 25°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,1 ml Kallikreinlösung, die 5 - 11 mU enthalten dürfen, wird die Reaktion gestartet. 2 min später wird die Extinktion bei 366 nm gegen einen Leerwert ohne Kallikrein bestimmt. Nach weiteren 5 und 10 min erfolgen wieder Ablesungen der Werte. Das Volumen der Kallikreinlösung kann durch entsprechende Variation der Puffermenge (Endvolumen 3 ml) zwischen 0,02 und 0,2 ml betragen. 1 mU Kallikrein entspricht dabei einer Extinktionsänderung ΔE von 0,0011/min oder dem Umsatz von 1 nMol Substrat/min.

bb) Mit Hilfe des Autoanalyzers der Firma Technicon

Will man eine Bestimmung von Kallikrein in Serienversuchen nach beschriebener Art durchführen, so läßt sich dies durch den Autoanalyzer automatisieren (78,79). Kallikreinwerte zwischen 20 und 2000 mU/ml Probelösung werden erfaßt.

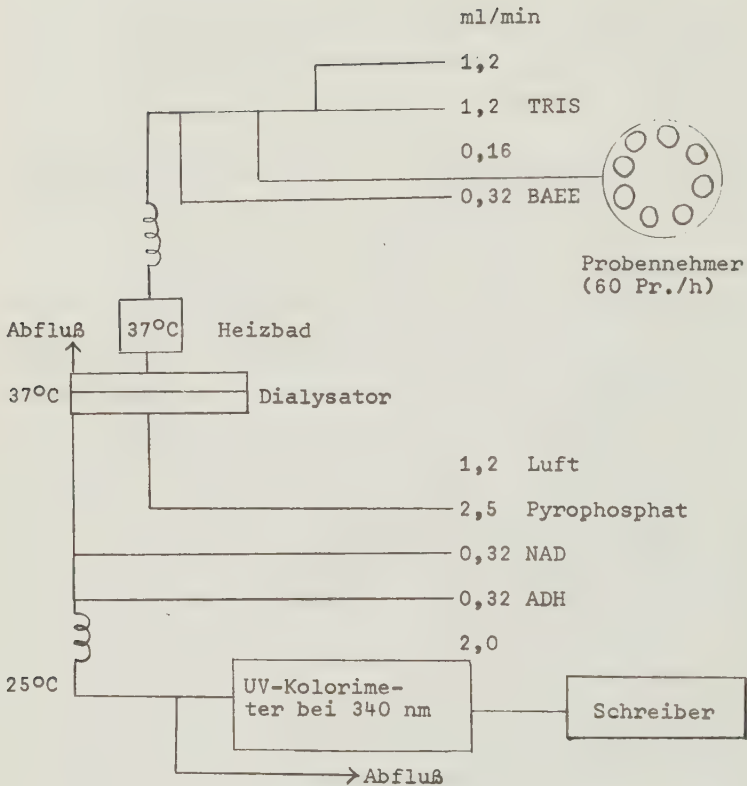


Abb.3: Fließschema zur Kallikrein-Bestimmung im Autoanalyzer (78)

Lösungen:

TRIS: 0,05 M TRIS-HCL-Puffer, pH 7,8, mit 0,2 ml Triton X-100/l

BAEE: 680 mg BAEE-HCl in 100 ml aqu. bidest.

PPP : 30,4 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$; 8,2 g Semicarbazid HCl;
1,8 g Glycin; 0,2 ml Triton X-100; 20 - 24 ml 2 N NaOH in 1 l; pH 8,7

NAD : 143 mg NAD in 100 ml aqu. bidest.

ADH : 0,5 ml ADH + 99,5 ml eisgekühltes aqu. bidest.

2. Quantitativer Nachweis der Hemmung von Kallikrein

Substanzen:

s.1.b), zusätzlich

TRA, pH 7,8 (1,24 g Triäthanolamin-hydrochlorid in etwa 70 ml aqu. bidest. lösen, mit 19 ml 0,2 N NaOH auf pH 7,8 einstellen und mit aqu. bidest. auf 100 ml auffüllen)

Ausführung:

Der Ansatz erfolgt zuerst im Reagenzglas. Zu je 0,1 ml Kallikreinlösung, welche etwa 100 mU enthalten, werden in das Vergleichsglas 0,9 ml, in die Meßgläser 0,8 bis 0,1 ml TRA-Puffer, zuletzt nur in die letzteren 0,1 bis 0,8 ml Inhibitorlösung pipettiert (Endvolumen 1 ml). Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur werden aus jedem Reagenzglas 0,1 ml in Küvetten mit unter 1.b) geschildertem Ansatz zur enzymatischen Bestimmung von Kallikreinaktivität pipettiert. Ablesung und Umrechnung der Extinktion auf mU Kallikrein erfolgen wie unter 1.b). Auf diese Weise kann eine Meßreihe gewonnen werden, welche in eine Hemmkurve graphisch übertragen wird.

3. Bestimmung des Proteingehalts in klaren Lösungen

Mittels der Biuret-Reaktion nach Weichselbaum (80) bei 546 nm wird der Proteingehalt von klaren Lösungen festgestellt. Damit läßt sich der Quotient U/mg Biuret-Protein angeben.

4. Quantitativer Nachweis der BAPNA-Spaltung durch Kallikrein

Substanzen:

N^ω-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid (BAPNA), Merck, Darmstadt; 0,2 M TRA, pH 7,8, EGA-Chemie

Ausführung:

Steigende Mengen Kallikrein (0 - 400 µg) werden in Küvetten mit 2 ml TRA-Puffer gelöst. Nach 5 min werden je 1 ml BAPNA-Lösung dazupipettiert. Die Mischung wird bei 25°C inkubiert und sofort danach ihre Extinktion bei 405 nm gegen den Leerwert gemessen (81,82). Jeweils nach 1 min wird über 10 min abgelesen. Eine Extinktionsänderung ΔE von 0,0033/min entspricht der Freisetzung von 1 nMol p-Nitroanilin aus BAPNA oder 1 mU (BAPNA).

5. Photometrische Eiweißbestimmung

Mittels eines Spektralphotometers, das mit einem Schreiber korreliert ist (Gerät: Unicam SP 800 der Fa. Leitz) kann über Extinktionsmessung bei 215 bzw. 280 nm der Eiweißgehalt von Säuleneeluaten bestimmt werden. Gemessen wird in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke bei 20°C.

Ausführung:

In der Vergleichsküvette befindet sich der entsprechende Waschpuffer, in den Meßküvetten je 3 ml Eluat. Die Wellenlänge wird fest eingestellt und die jeweilige Extinktion aufgezeichnet.

Aus dem Verlauf der Kurve läßt sich der Proteingipfel ersehen.

6. Photometrische Aktivitätsbestimmung

Mit dem beschriebenen Gerät Unicam läßt sich auch die Aktivität des Enzyms pro Extinktionseinheit bestimmen. Zu diesem Zweck wird das UV-Spektrum der Kallikreinlösung aufgezeichnet. Das Maximum der Absorptionskurve liegt bei 282 nm und die Extinktion ist dabei proportional der Kallikreinkonzentration. Die Anzahl der Units pro 1 ml Lösung (U/ml) wird daher ins Verhältnis zum Extinktionswert bei 282 nm gesetzt. Es resultiert eine Aktivitätsangabe in U/1,0 E.

7. Sephadex^R-Gelfiltration

Sephadex^R der Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden) ist ein modifiziertes Dextran, dessen Polysaccharidketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind. Größere Moleküle, wie Proteine, verlassen das Gel schneller als kleine, da sich letztere in Hohlräumen des Netzes "verfangen", in die die größeren Moleküle nicht eindringen können, und bei einer Säulenchromatographie später eluiert werden. So können Lösungen von Fremdstoffen gereinigt bzw. entsalzt werden. Geltyp und PerlgröÙe lassen sich durch die Bezeichnung G-25, G-50, G-75, G-100 markieren.

8. Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose

Ionenaustauscher setzen sich aus einer Matrix und aus geladenen Ionen zusammen, die an die Grundsubstanz chemisch gebunden sind. DEAE-Cellulose ist durch eingeführte Seitenketten positiv geladen. Die negativen Gegenionen können bei der Chromatographie durch Proteinionen ausgetauscht werden. Durch kontinuierlich oder schrittweise ansteigende Ionenstärkegradienten oder durch Änderung des pH-Wertes in Richtung auf den isoelektrischen Punkt wird dieser Vorgang umgekehrt. Die reversible Adsorption wird zur Trennung und Reinigung von Proteinen bzw. Enzymen angewandt.

Häufig werden Ionenaustausch und Gelfiltration kombiniert. Der Prozeß kann in einer Säule oder im sogenannten Batch-Verfahren durchgeführt werden. Für beide Arten gliedert sich der Vorgang in folgende Arbeitsschritte:

Äquilibrierung des Ionenaustauschers, Zugabe der Probe, Adsorption der Probe, Wechsel der Trennbedingungen, selektive Desorption der Anionen.

9. Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose

Material:

Langfaseriges Hydroxylapatit-Cellulosepulver MN 2 200-Apatit 50 (Macherey, Nagel und Co., Düren)

Schwache physikalische Kräfte, wie elektrostatische Anziehung zwischen polarisierbaren Molekülen oder Ionen, sowie van der Waalsche Kräfte oder chemische Verknüpfung sind für die Anreicherung eines Stoffes an der Grenzfläche zwischen zwei Phasen verantwortlich. Die Menge des adsorbierten Materials hängt von der Natur der zu adsorbierenden Substanz, des Adsorptionsmittels und von der Konzentration, mit der das Material im Gleichgewicht steht, ab. Mit steigender Konzentration sinkt die Adsorptionsfähigkeit des Adsorbens. Dies wird zur fraktionierten Auftrennung einer Substanz ausgenutzt und dadurch eine gewisse Reinigung erzielt. Der Schritt der Desorption läßt sich stufenweise oder mit kontinuierlich ansteigendem Puffergradienten durchführen.

10. Dialyse und Ultrafiltration

Zur Entsalzung der Fraktionen wird auch die Dialyse durchgeführt. Proteine diffundieren dabei nicht durch kleinporige Membranen, wie zum Beispiel Kollodium-, Pergament- oder Zellophanmembranen, während kleinere Moleküle oder Ionen passieren können.

Eine elegante Sonderform der Dialyse ist die Ultrafiltration, mit dem Gerät Diaflo der Fa. Amicon, welche, unter Druck und ständigem Rühren (Magnetrührer), durch Membranen kleinmolekulare Salze und proteinfreie Flüssigkeit aus der Proteinlösung entfernt. Es lassen sich dadurch auf bequeme Weise konzentrierte salzfreie

Enzymlösungen gewinnen, die weitergereinigt oder lyophilisiert werden können.

IV. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

1. Isolierung und Reinigung von Submandibularis-Kallikrein des Schweins

In Abänderung der Methode nach Werle und Trautschold (5) wurden Adsorption an Hydroxylapatit-Cellulose und Fraktionierung an Sephadex G-50 durchgeführt. Die Schritte Protaminsulfatfällung, Sephadex G-75-Gelfiltration und Säulenelektrophorese hatten bei der alten Methode kaum eine Aktivitätsanreicherung und nur geringe Ausbeute erbracht (90).

a) Ausgangsmaterial

Nach Vorschrift der Dissertation von Roder (12) wurden von der Fa. Bayer aus 40 kg Schweinesubmandibularisdrüsen als Hauptfällung mit Aceton (Kieselgur als Filterhilfsmittel) 2,225 kg Kallikrein-Adsorptionspulver mit einer Aktivität von 0,98 KE/mg oder 54 500 KE/kg Drüsengewebe hergestellt. 2,2 kg dieses Pulvers Nr. He 0103/1A wurden uns zur Verfügung gestellt.

b) Elution

Mit 1 M NaCl-Lösung wurde mehrmals das mit destilliertem Wasser

aufgeschlämmte Untersuchungsmaterial eluiert. Der Salzgehalt konnte durch eine Dialyse über einige Tage gegen oft ausgewechseltes Wasser vermindert werden. Für mehrere Wochen wurde die Lösung eingefroren.

c) Erste Fraktionierung an DEAE-Cellulose im Batch-Verfahren
In die aufgetaute Lösung wurde nun DEAE-Cellulose gerührt. Wegen der Säureempfindlichkeit von Kallikrein (26) lag die mit 0,1 M NH_4Ac -Puffer auf pH 6,7 eingestellte Cellulose in Acetatform vor. Aufgrund der Unbeständigkeit des Enzyms gegenüber Wärme fand das Batch-Verfahren im Eisbad statt. Vorübergehend wurde das pH auf 6,25 erniedrigt. Unter ständiger Aktivitätskontrolle wurde soviel DEAE-Cellulose eingerührt, bis der Überstand nur noch 1 - 2% der Gesamtaktivität enthielt. Mit 0,01 M NH_4Ac -Puffer, pH 6,7 wurde das Adsorptionsgemisch aus Cellulose und Protein 2x gewaschen. Eine Lösung aus 5% NH_4Ac und 2% NaCl , pH 6,6, eluierte fraktioniert die kallikreinhaltige Substanz. Beide Eluate zusammen enthielten eine Aktivität von 3 200 U. 5 weitere Chargen wurden ebenso an DEAE-Cellulose gebunden und mit einer Lösung von 5% NH_4Ac und 3% NaCl , pH 6,7 eluiert. Der Rückstand aus der DEAE-Behandlung wurde nach Dialyse nochmals mit 5% Verlust an DEAE adsorbiert und zu 86% mit 0,8 M NH_4Ac , pH 6,7, eluiert. Zur Entsalzung der Eluate erfolgte eine 24stündige Dialyse gegen 50 l destilliertes Wasser. Durch Gefriertrocknung mit Verlust um 1%

konnte sodann das Volumen verkleinert werden.

d) Fraktionierung an Sephadex G-75

Ein Teil des lyophilisierten Pulvers der jeweils ersten Eluate wurde weiterverarbeitet.

Zur Reinigung des Untersuchungsmaterials wurde Sephadex G-75 verwendet. Von der Gesamtmenge (etwa 22 000 U) wurden je ca. 1 000 bzw. 1 500 U in 45 ml 0,05 M NH_4Ac -Puffer, pH 6,5, gelöst und auf eine Säule (2,5 x 110 cm) aufgetragen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug im Durchschnitt 4,9 cm Säulenhöhe/Std. Bei Wasserkühlung (6 - 8°C), Uvicord- (260 nm) und Fraktomenanschluß (20 Min/Glas) wurde die Substanz mit 0,05 M NH_4Ac -Puffer, pH 6,5, in Fraktionen chromatographiert. Mit Hilfe der vom Uvicord aufgezeichneten Kurve und durch Enzymtests wurde der Proteingipfel im Eluat ermittelt, in dem sich der größte Kallikreingehalt befand. Diese Fraktion wurde dialysiert und konzentriert, das Übrige verworfen. So wurden 20 400 U bei 5%igem Verlust gewonnen.

Tab.2: Erste Fraktionierung an DEAE-Cellulose im Batch-Verfahren

spezifische Aktivität im Ausgangsmaterial: 0,36 U/mg
 Biuret-Protein;
 Waschpuffer: 0,01 M NH_4Ac , pH 6,7

Zahl der Versuche	1	5	1
eingesetzte Aktivität, U	3 260	70 700 ^a	10 600 ^b
Überstand, U	60	12 650 ^a	590 ^b
Überstand, %	1,8	18 ^a	5,5 ^b
Elution mit	5% NH_4Ac 2% NaCl pH 6,6	5% NH_4Ac 3% NaCl pH 6,7	0,8 M NH_4Ac , pH 6,7
Ausbeute,			
U	3 200	58 050 ^a	8 600 ^b
%	100	100 ^a	86 ^b
g	5	15 ^a	3 ^b
spezif. Aktiv. des Eluats, U/mg B.Pr.	1,05	1,3	

^a Gesamtergebnis der 5 Durchgänge

^b Gesamtergebnis der Fraktionierung aller Rückstände

e) Zweite Fraktionierung an DEAE-Cellulose über eine Säule
Der Salzgehalt wurde durch Dialyse erniedrigt, ehe die zweite Fraktionierung an DEAE-Cellulose über eine Säule durchgeführt wurde. Ein Teil der Proteinlösung (3825 U in 69 ml) wurde auf eine Säule (4,5 x 40 cm) aufgetragen. Nach Äquilibrierung mit einem Säulenvolumen an 0,1 M NH_4Ac , pH 6,7, wurde der kontinuierliche Puffergradient (1375 ml 0,1 - 2050 ml 1,0 M NH_4Ac , pH 6,7) angeschlossen. Ein einziger langgezogener Peak wies auf eine geringe Reinigung des Kallikreins hin. Deshalb wurde ein steilerer Puffergradient verwendet. Über Vorversuche an kleineren Säulen und Rechromatographien der unreineren Fraktionen wurde bei einem Pufferanstieg von 0,05 M - 1,0 M bzw. 1,2 M NH_4Ac eine gute Reinigung des Untersuchungsmaterials erzielt. Die Ausbeute betrug rund 80%.

f) Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose
Zum Aufschlännen der Cellulose wurde 0,001 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (prim. : sek. = 1 : 1), pH 7,0, benutzt. Alle verwendeten Lösungsmittel waren mit Chloroform gesättigt. Die Cellulose wurde dann kontinuierlich in eine wassergekühlte Säule von 5 cm Durchmesser gegossen, bis eine Füllhöhe von 14 cm erreicht war. Nach dem Äquilibrieren mit 0,01 M Phosphatpuffer wurde die Säule mit einer kleinen Menge Proteinlösung beschickt (1230 U in 2,5 ml, mit 0,02 M Phosphatpuffer im Verhältnis 1 : 1 versetzt). Danach wurde stufenweise mit Phos-

phatpuffer steigender Molarität (10 - 80 mM) jeweils solange gewaschen, bis der Proteingehalt im Eluat bei der betreffenden Pufferkonzentration wieder abnahm. Mit 0,1 M Puffer, pH 7,0, wurde das auf der Säule verbliebene Kallikrein desorbiert (Tab.3). Da aber bis zum 0,06 M Puffer nur Spuren von Kallikrein eluiert wurden, wurde bei den folgenden Chromatographien ein kontinuierlicher Puffergradient von 0,05 - 0,07 M, je 700 ml, eingesetzt. Es wurde nun die 3 - 4fache Menge an Substanz aufgetragen, mit 0,1 M Puffer, im Verhältnis 1 : 1, versetzt. Die Eluate wurden mittels Autoanalyzers auf Kallikreinaktivität ausgetestet (s.Abb.4), in je 3 Fraktionen gesammelt, getrennt dialysiert und eingeengt. Durch Rechromatographie der unreinen Konzentrate ließ sich der Reinheitsgrad um 15% erhöhen (Tab.4).

g) Fraktionierung an Sephadex G-50

Zur Entsalzung wurden die reinsten Fraktionen nochmals durch Ultrafiltration dialysiert und an einer Sephadex G-50-Säule (3 x 135 cm; Puffer: 0,001 M NH_4Ac , pH 7,0, Chloroform) fraktioniert (s.Tab.5 und Abb.5). Nach Lyophilisierung der kallikreinhaltigsten Eluate wurde ein weißes lockeres Pulver gewonnen. Über den Unicam ließ sich die spezifische Aktivität des Enzyms, bezogen auf $E = 1,0$, bestimmen (Abb.6).

Tab.3: Chromatographie eines Submandibularis-Kallikrein-Präparats an Hydroxylapatit:

5 x 13 cm-Säule; Pufferdurchfluß: 30 ml/h; Elutionsgeschwindigkeit: 3,82 cm Säulenhöhe/h; Puffer: $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (1 : 1), pH 7,0

	Puffervol., ml	Aktivität, U	Ausbeute, %
Aufgetragene Kallikreinmenge, in 0,02 M PP gelöst	5	1 230	100
Aktivität im Ausgangsmaterial, bezogen auf E = 1,0		57,8	
Eluiert mit Puffer, M			
0,01	472	Spuren	
0,03	245	Spuren	
0,04	200	Spuren	
0,05	160	0	
0,06	400	630	51,25
0,07	440	165,4	13,5
0,08	280	80,6	6,5
0,1	250	40	3,25
Summe		915	74,5
Aktivität der reinsten Fraktion, bezogen auf E = 1,0		82,5	

Tab.4: Chromatographie verschieden reiner Submandibularis-Kallikrein-Präparate vom Schwein an Hydroxylapatit-Cellulose:

5 x 14 - 15 cm-Säulen; Elutionsgeschwindigkeit: 3,16 cm/h;
Puffer: 700 ml 0,05 M - 700 ml 0,07 M Natriumphosphat
(prim. : sek. = 1 : 1), pH 7,0

Aufgetragene Menge, U	4 850	4 850	4 850	3 622	2 436
ml	20	20	20	55	20
Aktivität im Ausgangsmate- rial, bezogen auf E = 1,0	57,8	57,8	57,8	40,5	65
Ausbeute, U %	2 897 60	3 630 75	3 424 70,5	2 325 64,3	1 189 50
Aktivität der reinsten Frak- tion, bezogen auf E = 1,0	82,5	84,4	84,6	56,5	72,5

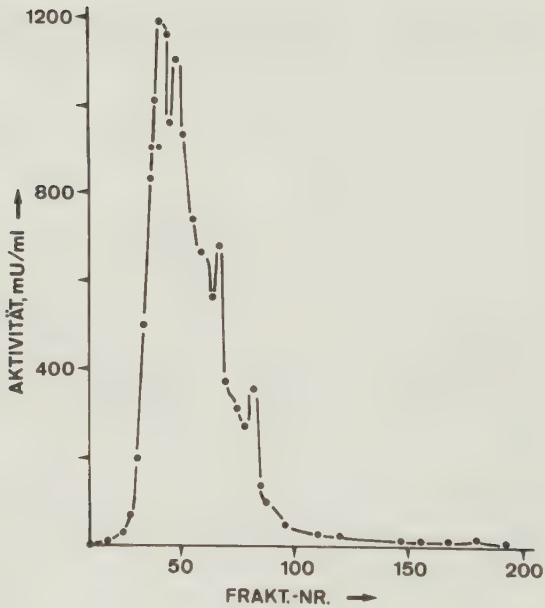


Abb.4: Chromatographie von Submandibularis-Kallikrein an Hydroxylapatit

Ordinate: Aktivität des Enzyms, mU/ml

Abszisse: Fraktionsnummer des Eluats

Säule: 5 x 14 cm; kontinuierlich steigender Puffergradient 0,05 - 0,07 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0; Elutionsgeschwindigkeit: 1,53 cm/h; Aktivitätsbestimmung nach entsprechender Verdünnung am Autoanalyzer;

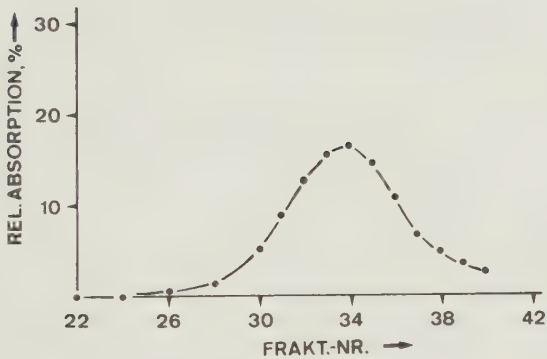


Abb.5: Fraktionierung von Submandibularis-Kallikrein an Sephadex G-50

Ordinate: Relative Absorption bei 260 nm, %

Abszisse: Fraktionsnummer des Eluats

Säule: 3 x 135 cm; Puffer: 0,001 M NH_4Ac , pH 7,0; Elutionsgeschwindigkeit: 3,16 cm/h;

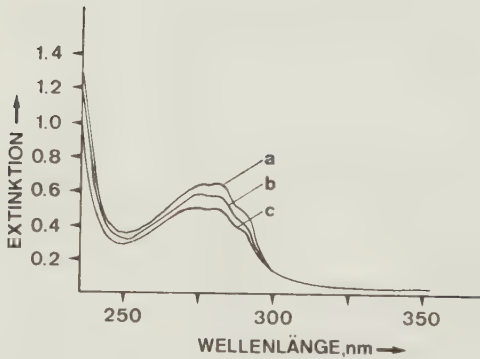


Abb.6: UV-Spektren verschiedener reiner Submandibularis-Kallikrein-Präparate (Spektralphotometer: Unicam SP 800)

Ordinate: Extinktion

Abszisse: Wellenlänge, nm

Kurve a: 125 U/mg Protein; 950 μ g Einwaage/2 ml aqu.dest.
+ 0,02 M TRA $\cdot$ HCl + 0,1 M NaCl, pH 7,5; 59,05 U/ml

Kurve b: 72,3 U/mg Protein; 1 080 μ g Einwaage/2 ml Lösung
(s.o.); 39,05 U/ml

Kurve c: 88,1 U/mg Protein; 970 μ g Einwaage/2 ml Lösung
(s.o.); 42,725 U/ml)

Gemessen wurde gegen die entsprechende Lösung ohne Kallikrein in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke bei 20°C; 2 ml Volumen;

Tab.5: Fraktionierung verschieden reiner Submandibularis-Kallikrein-Präparate an Sephadex G-50

3 x 135 cm-Säule; Elutionsgeschwindigkeit: 3,16 cm/h;
Pufferdurchfluß: 22,5 ml/h; Puffer: 0,001 M NH₄Ac, pH 7,0;

Aufgetragene Kallikreinmenge, U	3 790	3 080	2 335
ml	14	14	27,5
Aktivität im Ausgangsmaterial, bezogen auf E = 1,0	80	80	83
Ausbeute, U	2 290	2 605	1 715
%	61 ^a	85 ^a	73,5
mg	26	21	23,7
Aktivität der Hauptfraktion, bezogen auf E = 1,0	88	92,3	68,6 ^b
Spezif.Aktivität der Hauptfraktion, U/mg Einwaage	88,1	125	72,3

^a Verlust durch Herausschneiden der reinsten Fraktion

^b Verlust vermutlich durch Denaturierung

Tab.6: Ergebnisse der Reinigung von Submandibularis-Kallikrein des Schweines

	Aktivität, U		spezifische Aktivität, U/mg Einwaage	U/1,0 E	Ausbeute, %
	eingesetzt	eluiert ^c			
Adsorptionspulver HE 0103/1A mit 1 M NaCl eluiert; Dialyse		84 560	0,364		100
1.Fraktion.DEAE-C; Dialyse, Lyophil.	84 560	69 850	1,05-1,3		83
Fraktion.Seph. G-75; Dialyse	22 000 ^a	20 400			95
2.Fraktion.DEAE-C; Rechrom.;Dialyse	20 400	19 400	55,7-97,5	32,1-58	95
Chrom.Hydroxylapatit Rechrom.; Dialyse	19 400	12 070		63-87	62
Fraktion.Seph. G-50; Dialyse, Lyophil.	9 200 ^a	6 610 ^b	75 - 125	69-92	72

^a Nur ein Teil der im vorangehenden Schritt eluierten Menge wurde weiterverarbeitet
^b Verlust durch Herausschneiden der reinsten Fraktion
^c Unter eluierter Aktivität wird das gesammelte Eluat (ohne verworfenen Rest) aufgeführt

2. Reinigung und Isolierung von Kallikrein aus Schweineharn

a) Organentnahme und Gewinnung der Extrakte

Die Harnblasen wurden den eben getöteten Schlachttieren entnommen und in einen Behälter ausgedrückt. Es wurden so 36 l Harn mit 2,2 KE/ml gewonnen. Bei 4°C, mit etwas Toluol überschichtet, wurden sie bis zur Weiterverwertung aufbewahrt.

b) Acetonfällungen

Mit 36 l Aceton wurde nun der Harn versetzt; der nach 5 h abzentrifugierte Niederschlag wurde verworfen. Zum Überstand wurde ein zweites Mal Aceton im Verhältnis 1 : 1 (v : v) gegeben. Der kallikreinhaltige Niederschlag wurde zweimal in aqu.dest. gelöst (1,6 l). Eine dritte Fällung zeigte einen trüben Überstand. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde zweimal in aqu.dest. gelöst (1,3 l).

Zur Entsalzung wurde eine Dialyse gegen 250 l aqu.dest. für 3 Tage angeschlossen. Danach wurden 2,75 l Lösung zu 13 g Pulver lyophilisiert.

c) Fraktionierung an Sephadex G-75

In 6 Chargen, zu je 45 ml, wurde das gelöste Material über eine wassergekühlte Sephadex G-75-Säule (2,5 x 110 cm; Puffer: 0,05 M NH₄Ac, pH 6,0, chloroformgesättigt, Elutionsgeschwindigkeit: 4,9 cm Säulenhöhe/h) weiter gereinigt. Mittels der Biuret-Reaktion konnte eine Aktivitätszunahme pro mg Protein bei geringem

Verlust festgestellt werden. Auf jede Säulenchromatographie folgte eine Ultrafiltration. Die Gefriertrocknung ergab 6 g Pulver.

d) Erste Fraktionierung an DEAE-Cellulose

Eine mit 0,1 M NH_4Ac -Puffer, pH 6,7, äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (2 x 40 cm, Wasserkühlung) wurde mit 100 U Untersuchungsmaterial beschickt. Mit einem Säulenvolumen des genannten Puffers wurde das pH auf 6,7 eingestellt und die Substanz durch einen kontinuierlichen Puffergradienten (550 ml 0,1 M - 825 ml 1,0 M NH_4Ac , pH 6,7) eluiert. Auf eine dickere Säule (4,5 x 40 cm) konnte das 7 - 10fache an Substanz (in 45 ml gelöst) aufgetragen werden. Der Puffergradient hatte sich in bezug auf die Reinigung als günstig erwiesen, so daß nur das Volumen auf 1375 ml/2050 ml vergrößert werden mußte.

e) Zweite Fraktionierung an DEAE-Cellulose

Die kallikreinhaltigsten Fraktionen der Säuleneluats wurden konzentriert, dialysiert und an DEAE-Cellulose rechromatographiert. Im mittleren Bereich des Eluats fand sich die Hauptaktivität. So wurden 3 Chargen getrennt weiterverarbeitet.

f) Chromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose

Ein Vorversuch an einer geringen Menge Kallikrein wurde an einer kleinen Hydroxylapatitsäule (2 x 7,5 cm) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungsmittel waren mit Chloroform gesättigt. Hydroxylapatit-Cellulose wurde mit 1 mM Phosphatpuffer (prim. : sek. = 1 : 1), pH 7,0, aufgeschlämmt, in der Säule mit 10 mM Puffer äqui-

libriert, mit Substanz beschickt und diese mit stufenweise ansteigendem Gradienten (10 - 70 mM) bei 6 - 8°C eluiert. Mit 0,1 M Puffer konnte der Rest desorbiert werden. Es wurde eine gute Reinigung erzielt (s.Tab. 7a).

Bei der Wiederholung des Versuchs mit einer größeren Ausgangsaktivität über eine dickere Säule (5 x 11 cm) zeigte sich eine andere Verteilung im Eluat: Mit dem 70 und 100 mM Puffer wurden ca. 83% der Ausgangsmenge gewonnen, während mit den niedriger molaren Puffern nur Spuren von Kallikrein eluiert wurden (s.Tab. 7b). An Hand der Chromatographie des übrigen Materials wurde untersucht, ob das Eluat durch Einfügen von 55 bzw. 62 mM Waschpuffer bereits früher kallikreinhaltig und ob dadurch die Fraktionierung ausgiebiger sei. Nur Spuren von Kallikrein wurden auch in diesen Versuchen bei Puffern unter 70 mM ausgetestet. Die Hauptaktivität fand sich bei 70 mM Puffer (s.Tab. 8). Mit dem photometrischen Eiweißtest bei 220 nm wurden die Säuleneluate auf den Proteingehalt geprüft (s.Abb. 7), in 3 - 4 Fraktionen getrennt dialysiert und eingengt.

g) Fraktionierung an Sephadex G-50

Die reinsten Fraktionen wurden über Sephadex G-50 weitergereinigt (Tab.9). Über das Gerät Unicam ließ sich die spezifische Aktivität des Enzyms, bezogen auf E = 1,0 bestimmen (Abb.8).

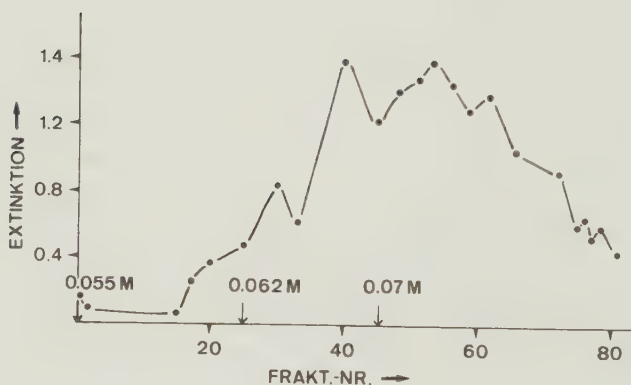


Abb.7: Chromatographie von Harn-Kallikrein an Hydroxylapatit

Ordinate: Extinktion bei 220 nm

Abszisse: Fraktionsnummer des Eluats

Säule: 5 x 11,5 cm; stufenweise steigender Puffer-
gradient: 0,03; 0,055; 0,062; 0,07 M Na_2HPO_4 /
 NaH_2PO_4 , pH 7,0;

Elutionsgeschwindigkeit: 1,53 cm/h

Mit Hilfe des Gerätes Unicam SP 800 wurde der Protein-
gehalt des Eluats photometrisch bestimmt.

Tab.7: Chromatographie verschiedener Mengen Harn-Kallikrein an Hydroxylapatit

Pufferdurchfluß: 30 ml/h

	a			b		
	Elutionsgeschw.: 9,56 cm/h	Aktiv., U	Ausbeute, %	Elutionsgeschw.: 1,51 cm/h	Aktiv., U	Ausbeute, %
Aufgetragene Kallikrein- menge	5	124	100	46	1182	100
Aktivität im Ausgangs- mat., bez. auf E = 1,0		8,64			8,64	
Eluiert mit Puffer, M						
0,01	102	0	0	215	0	0
0,03	50	1,28	1,03	230	Spuren	
0,05	22,5	7,35	5,9	180	Spuren	
0,07	36	60,72	49	500	798,8	67,5
0,1	45,5	29,14	23,5	340	178,5	15,1
Summe		89,49	79,4		978,3	82,6
Aktivität der reinsten Frak- tion, bez. auf E = 1,0		18,19			22,45	

Tab.8: Chromatographie verschieden reiner Harn-Kallikrein-Präparate an Hydroxylapatit

Pufferdurchfluß: 30 ml/h; Elutionsgeschwindigkeit: 1,51 cm/h;

Aufgetragene Kallikreinmenge	Puffervol., ml	Aktivität, U	Ausbeute, %	Puffervol., ml	Aktivität, U	Ausbeute, %
Aktivität im Ausgangsmaterial, bezogen auf E = 1,0	43	1103	100	220	656	100
Eluiert mit Puffer, M		8,64		-	2,25-4,05	-
0,01	300	0	0	0	-	-
0,03	235	0	0	160	0	0
0,055	200	0	0	100	Spuren	0
0,062	150	Spuren	0	160	1	1,3
0,07	910	828,7	78	1100	630	95,7
Summe		828,7	78		631	97
Aktivität der reinsten Fraktion, bez. auf E = 1,0		23,9			7,9	

Tab.9: Versuchsdurchführung und Ergebnisse

Sephadex G-50-Säule: 3 x 120 cm; Puffer: 0,001 M NH_4Ac ,
pH 7,0; Elutionsgeschwindigkeit: 3,16 cm/h;

Aufgetragene Kallikrein- menge, U	881	644	922
ml	13,5	11,5	13,5
Aktivität im Ausgangsma- terial, bez. auf E = 1,0	23	19,5	10,45
Ausbeute, U	622 ^a	552 ^b	860
%	70,5	80,7	93,4
mg	19,6	23,5	59,9
Aktivität der Hauptfrak- tion, bez. auf E = 1,0	35,3	23,75	15,32
Spezif.Aktiv. der Haupt- fraktion, U/mg Einwaage	31,75	23,45	14,35

^a Verlust durch Herausschneiden der reinsten Fraktion
^b Verlust durch Zerspringen des Kolbens an der Lyo

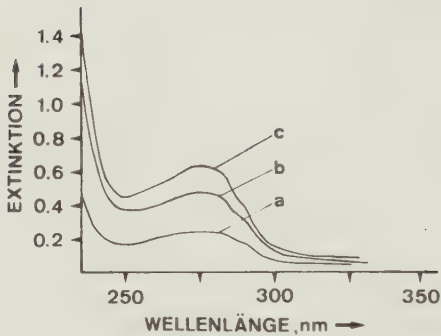


Abb.8: UV-Spektren verschieden reiner Harn-Kallikrein-Präparate
(Spektralphotometer: Unicam SP 800)

Ordinate: Extinktion

Abszisse: Wellenlänge, nm

Kurve a : 31,75 U/mg Protein; 530 μg Einwaage pro 2 ml
aqu.dest. + 0,02 M $\text{TRA}\cdot\text{HCl}$ + 0,1 M NaCl, pH
7,5; 8,4 U/ml Lösung;

Kurve b : 23,45 U/mg Protein; 900 μg Einwaage pro 2 ml
Lösung (s.o.); 10,55 U/ml Lösung;

Kurve c : 14,35 U/mg Protein; 1230 μg Einwaage pro 2 ml
Lösung (s.o.); 8,815 U/ml Lösung;

Gemessen wurde gegen die entsprechenden Lösungen ohne
Kallikrein in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke bei
20°C; 2 ml Volumen;

Tab.10: Ergebnisse der Reinigung von Harn-Kallikrein

	Aktivität, U	Spezifische Aktivität, U/mg Einwaage	Aktivität, U/1,0 E	Ausbeute, %
36 l Schweineharn	4850	0,0185		100
Schweineharn + Aceton 1 : 1; zentrifugiert	4820	0,0224		99,5
Überstand + Aceton 1 : 1; zent.; Niederschlag in aqu.dest.	4760	0,126		99
Extrakt + Aceton 1 : 1; Niederschlag in aqu.dest.				
Dialyse 3 Tage; Lyophilisation	4675	0,528		98
Fraktion. Sephadex G-75; Dialyse, Lyophilisation	4200	0,694		90
Frakt. DEAE-C; Dialyse	3549	4,04	7,97	84,6
Rechrom. DEAE-C; Dialyse	3073		2,3-8,64	86,5
Chrom. Hydroxylapatit; Dialyse	2537 ^a		7,9-23,9	82,5
Frakt. Seph. G-50; Dialyse, Lyophil.	2034 ^b	14,4 - 31,8	15,32-35,5	83,1

^a Nur die reinste Fraktion (2447 U) wurde weiter verarbeitet.

^b Verlust durch Herausschneiden der reinsten Fraktion.

3. Charakterisierung des isolierten Submandibularis- und Harn-Kallikreins vom Schwein und Vergleich mit dem Pankreas-Kallikrein

a) Hemmung von Pankreas-, Submandibularis- und Harn-Kallikrein durch den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Kinderorganen

Nach der unter III.2. beschriebenen Methode zur Bestimmung der Kallikreinhemmung wurde jeweils die verbleibende Enzymaktivität nach 10 min Inkubation mit steigenden Mengen Trasylol^R bei 366 nm bestimmt. Den Verlauf der Meßreihen geben die Hemmkurven wieder (Abb.9).

Ergebnisse: Vergleicht man die Kurven von Pankreas-, Submandibularis- und Harn-Kallikrein, so verlaufen die ersten beiden steil und entsprechen einander fast im Gegensatz zur Harn-Kallikrein-Hemmkurve, welche sehr flach aussieht. Dieselbe Menge Trasylol^R inaktiviert im linearen Bereich jedoch mehr Kallikrein des Pankreas als das der Mundspeicheldrüse. Einer 50%igen Hemmung (50%) des Pankreas-Kallikreins entspricht eine 17,5%ige Inhibition des Harn-Kallikreins, einer 50%igen Hemmung des Submandibularis-Kallikreins dagegen eine 21,3%ige Inaktivierung des Harn-Kallikreins. Ein linearer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Hemmung der Enzymaktivität und der Menge an Inhibitor läßt sich feststellen. Die Pankreas-Kallikrein-Kurve zeigt einen linearen Verlauf bis zu einer 69,5%igen Hemmung des vorgelegten Kallikreins. Die Inhibition von Submandibularis-Kallikrein verläuft bis zu

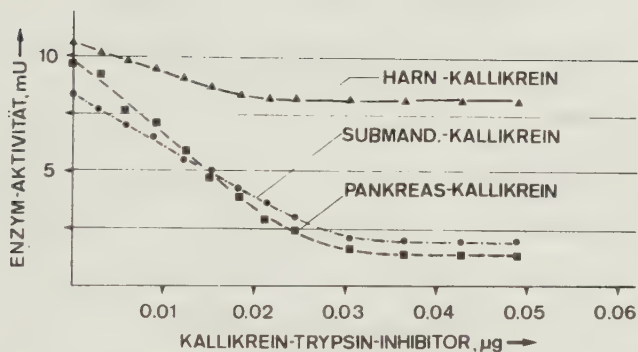


Abb. 9: Hemmung von Pankreas-, Submandibularis- und Harn-Kallikrein des Schweines durch den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen (Trasylol^R) (Hemmkurven)

Ordinate: Verbleibende Aktivität von Pankreas-, Harn- und Submandibularis-Kallikrein, mU, nach Zugabe entsprechender Inhibitormengen (s. Abszisse)

Abszisse: Zum Ansatz zugegebene Menge Trasylol^R, µg

Die Durchführung der Hemmung ist im Text beschrieben.
Substrat: BAEE

Spezif. Aktivität des verwendeten Harn-Kallikreins: 31,75 U/mg Pr.

Spezif. Aktivität des Submandibularis-Kallikreins: 125 U/mg Pr.

Pankreas-Kallikrein-Präparat SK-K 141/1 der Fa. Bayer, gereinigt bis zur spezif. Aktivität von 99,7 U/mg Protein.

63,8% linear, während bei Harn-Kallikrein eine Linearität bis zu 21,7% besteht.

b) Hemmung von Pankreas-Kallikrein durch den Schweinesperma-Inhibitor

Material: Pankreas-Kallikrein: Präparat der Fa. Bayer, Nr. SK-K 141/1, gereinigt, spezifische Aktivität: 99,7 U/mg Protein; Schweinesperma-Inhibitor: Präparat von G. Müller-Bardorff (83), spezifische Aktivität: 2 IU/mg; Substrat: BAEE; Pankreas-Kallikrein wurde mit 0,03 und 0,5 μ g SSI über 10 min inkubiert und die verbleibende BAEE-spaltende Aktivität des Enzyms im optischen Test bei 366 nm bestimmt.

Ergebnis: Mit 0,5 μ g SSI ließ sich ein Aktivitätsverlust von 14,5 % (vom Leerwert 130 zu Δ E 111) feststellen, während 0,03 μ g SSI nur minimale Hemmwirkung zeigten (vom Leerwert 130 zu Δ E 128). Es handelt sich bei der Inhibierung von Kallikrein durch Schweinesperma-Inhibitor höchstwahrscheinlich um einen unspezifischen Hemmeffekt, da, unter Berücksichtigung der Molekulargewichte und eines 1 : 1 Inhibitor-Enzym-Komplexes, eine vollständige Hemmung von 0,1 μ g Kallikrein bereits bei 0,03 μ g SSI eintreten müßte.

c) Quantitative Bestimmung der BAPNA-spaltenden Aktivität von Pankreas-, Harn- und Submandibularis-Kallikrein

Steigende Mengen Kallikrein wurden nach beschriebener Methode (III.4.) mit BAPNA versetzt und die substratspaltende Aktivität

des Enzyms mit Hilfe des optischen Tests bei 405 nm gemessen. Die Extinktionsänderung wird durch hydrolytische Abspaltung von p-Nitroanilin aus dem Substrat hervorgerufen. Eine BAPNA-spaltende Aktivität von Humanalbumin wurde unter gleichen Bedingungen wie die Kallikreine geprüft.

Ergebnisse:

Pankreas-Kallikrein:

Menge Kallikrein, μg	200
mU	19940
Aktiv., mU (BAPNA)	0,4

Submandibularis-Kallikrein:

Menge Kallikrein, μg	10	50	100	200	400	950
mU	1250	6250	12500	25000	50000	118750
Aktiv., mU (BAPNA)	0	0,3	0,7	1,6	2,4	5,1

<u>Harn-Kallikrein</u> , μg	10	50	200	990
mU	318	1590	6360	30482
Aktiv., mU (BAPNA)	0	0,03	0,6	4,9

Die 3 Kallikreine spalten BAPNA, Submandibularis-Kallikrein zeigt die größte substratspaltende Aktivität, Pankreas-Kallikrein die geringste (4 : 1 bei 200 μg Enzym). Trypsin spaltet unter gleichen Bedingungen etwa 140 mal soviel Substrat wie Submandibularis-Kallikrein, 330 mal soviel wie Harn-Kallikrein und 500 mal soviel wie Pankreas-Kallikrein.

d) Vergleich der biologischen Aktivität von Kallikreinen aus Pankreas, Glandula submandibularis und Harn vom Schwein

Kallikreine senken bei den üblichen Versuchstieren den mittleren arteriellen Blutdruck. Ihre Kreislaufwirkung unterscheidet sich aber, je nach Herkunft des Enzyms, in ihrem Ausmaß. Nach bekannter Versuchsanordnung (III. 1a) wurden einem narkotisierten Hund abwechselnd Proben von Harn-, Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein in die vena saphena gespritzt.

aa) Kallikreine ohne Inhibitor

Lösungen wurden zubereitet, welche 9 - 10 mU Kallikrein/0,1 ml enthielten. 5 - 10 sec nach i.v. Injektion von 0,1 ml Harn-Kallikrein setzte die Blutdrucksenkung ein und erreichte in ca. 30 sec ihr Maximum: eine Differenz zum Ausgangswert von 18 - 20 mm Hg $\hat{=}$ 20% Abfall. 1 bis 2 ml physiologische Kochsalzlösung wurden nach jeder Kallikreininjektion nachgespritzt. Innerhalb von 3 min hatte der Blutdruck seinen Ausgangswert wieder erreicht. 2 min später wurden 0,2 ml Submandibularis-Kallikrein injiziert und die Aufzeichnung des Schreibers beobachtet. Im Abstand von je 5 min wurden Versuche mit den folgenden Substanzproben durchgeführt, die aus den Legenden der Abb. 10 und 11 zu entnehmen sind. Zwischendurch wurden immer als Bezugsgröße 0,1 ml Pankreas-Kallikrein injiziert.

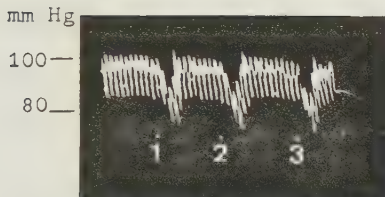


Abb.10: Verlauf der Carotisdruckkurve nach i.v. Injektion von Kallikreinen

Erster Hund, 8 kg, Morphinum-Pernocton^R-Narkose, künstliche Beatmung, Carotisdruck, Ludwigsches Quecksilbermanometer;

- 1) 0,1 ml Harn-Kallikrein
- 2) 0,2 ml Submandibularis-Kallikrein
- 3) 0,2 ml Pankreas-Kallikrein

1 cm Blutdruckamplitude entspricht 20 mm Hg

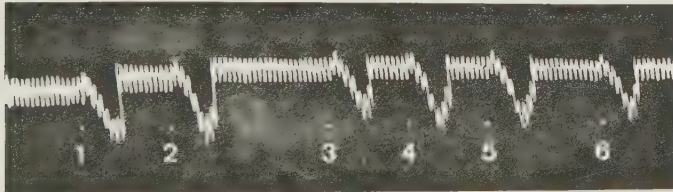


Abb.11: Verlauf der Carotisdruckkurve nach i.v. Injektion von Kallikreinen

Zweiter Hund, 10 kg, Morphinum-Pernocton^R-Narkose, künstliche Beatmung, Carotisdruck, Ludwigsches Quecksilbermanometer;

- 1) 0,1 ml Submandibularis-Kallikrein
- 2) 0,1 ml Pankreas-Kallikrein
- 3) 0,05 ml Harn-Kallikrein + 0,05 ml physiol.Kochsalzlsg.
- 4) 0,1 ml Pankreas-Kallikrein
- 5) 0,06 ml Harn-Kallikrein + 0,06 ml physiol.Kochsalzlsg.
- 6) 0,1 ml Submandibularis-Kallikrein

Ergebnisse: Die Versuchsreihe zeigt, daß Harn-Kallikrein, verglichen mit Pankreas-Kallikrein, biologisch aktiver ist. Bei gleicher BAEE-spaltender Aktivität verhält sich Harn-Kallikrein zu Pankreas-Kallikrein in der Blutdruckwirksamkeit wie 1,65 : 1. Eine Lösung von 10 mU Harn-Kallikrein senkt dagegen den Blutdruck doppelt so stark wie dieselbe mU-Menge Submandibularis-Kallikrein. Zwischen der biologischen Aktivität von Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein läßt sich das Verhältnis 1 : 0,85 feststellen. So ergibt sich bei der Umrechnung von enzymatischer in biologische Aktivität der 3 untersuchten Kallikreine folgender Zusammenhang:

1 U $\hat{=}$ 10 KE Pankreas-Kallikrein (84)

1 U $\hat{=}$ 8,5 KE Submandibularis-Kallikrein

1 U $\hat{=}$ 16,5 KE Harn-Kallikrein

bb) Kallikreine mit Inhibitor

Lösungen von Harn-, Submandibularis- und Pankreas-Kallikrein (mit einer Konzentration von ca. 100 mU Enzym/0,1 ml im Reagenzglas) wurden mit soviel Trasylol^R (0,366 μ g/0,3 ml) inkubiert, daß sich im enzymatischen Kallikrein-Inhibitor-Test eine 50%ige Hemmung von Pankreas-Kallikrein ergab. Die Abnahme der BAEE-spaltenden Aktivität von Harn- und Submandibularis-Kallikrein wurde ermittelt. Mit diesen inkubierten Lösungen wurde am narkotisierten Hund das quantitativ unterschiedliche Hemmverhalten von Trasylol^R gegenüber den Kallikreinen untersucht. Zum Vergleich spritzte man

ungehemmte Kallikreine. Der Injektion von 0,2 ml Pankreas-Kallikrein-Trasylol^R-Lösung folgte ein Standard von 0,1 ml desselben nicht inhibierten Enzyms. Weitere Beispiele der Versuchsreihe sind aus der Legende der Abb. 12 - 14 zu entnehmen.

Ergebnisse: Im Enzymtest bei 366 nm wurde das Ergebnis von 3.a) bestätigt: Eine bestimmte Menge Trasylol^R hemmt Pankreas-Kallikrein mehr als Kallikrein der Submandibularis-Drüsen. Einem 50 %igen Verlust an BAEE-spaltender Aktivität des Pankreas-Kallikreins entspricht für Submandibularis-Kallikrein eine Aktivitätsabnahme von 48% und für Harn-Kallikrein von 17%. Es wird die im enzymatischen Test bestimmte 50%ige Hemmung von Pankreas-Kallikrein auch im biologischen Test bewiesen. Beim Vergleich der Blutdrucksenkung durch ungehemmtes und gehemmttes Submandibularis-Kallikrein zeigt sich ferner, daß 45 - 55% dieses Enzyms durch die genannte Menge Trasylol^R inaktiviert worden sind. Dieselbe Inhibitormenge bewirkt am Harn-Kallikrein einen 13 - 25 %igen Verlust der biologischen Aktivität.

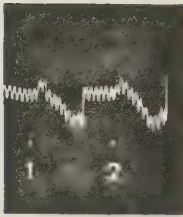


Abb.12: Hemmung von Pankreas-, Submandibularis- und Harn-Kallikrein durch Trasylol^R

Dritter Hund, 10 kg, Morphinum-Pernocton^R-Narkose, künstliche Beatmung, Carotisdruk, Hg-Manometer, i.v. Injektionen;

- 1) 0,2 ml Pankreas-Kallikrein + Trasylol^R
- 2) 0,1 ml Pankreas-Kallikrein

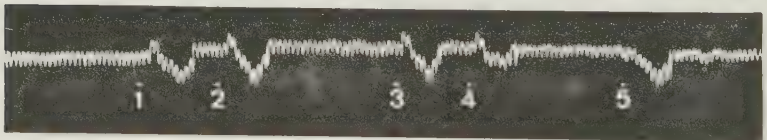


Abb.13: 1) 0,2 ml Submandibularis-Kallikrein + Trasylol^R
2) 0,1 ml Submandibularis-Kallikrein
3) 0,2 ml Harn-Kallikrein + Trasylol
4) 0,1 ml Harn-Kallikrein
5) 0,17 ml Harn-Kallikrein

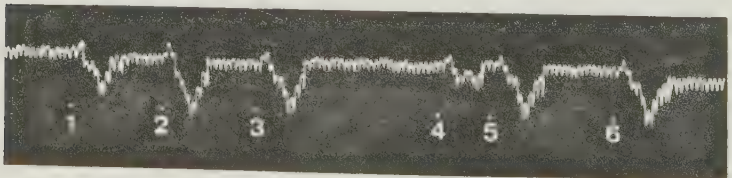


Abb.14: 1) 0,2 ml Harn-Kallikrein + Trasylol
2) 0,2 ml Harn-Kallikrein
3) 0,15 ml Harn-Kallikrein
4) 0,15 ml Pankreas-Kallikrein
5) 0,3 ml Pankreas-Kallikrein
6) 0,3 ml Submandibularis-Kallikrein

D. D I S K U S S I O N

I. Isolierung und Reinigung von Submandibularis-Kallikrein des Schweines

1. Frühere Methoden

Werle und Trautschold isolierten Submandibularis-Kallikrein des Schweines durch Acetonfällung des Rohextraktes aus Drüsen und durch zweimalige Fraktionierung an DEAE-Cellulose (5). Werle und Roder (12) ergänzten später diese Methode mit Protaminsulfatfällung und dreimaliger Fraktionierung an Sephadex G-75 abwechselnd mit Säulenelektrophoresen an ätnanolisierter Cellulose. Während die erstgenannten Schritte gute Ergebnisse brachten, mußten bei letzteren neben der Aufwendigkeit hohe Ausbeuteverluste in Kauf genommen werden (12).

2. Unsere Methode (Tab.6)

Wir bemühten uns, durch wenige Schritte einen möglichst geringen Substanz- und Aktivitätsverlust zu erreichen. Die Reihenfolge der Schritte wurde durch das unterschiedliche Fassungsvermögen der Materialien bestimmt. Da Ionenaustauscher, wie DEAE-Cellulose, eine sehr hohe Adsorptionskapazität für Proteine zeigen, demnach größere Verunreinigungen des Präparats beseitigen, führten wir zu Beginn der Isolierung nach der Acetonfällung eine

zweimalige Fraktionierung an DEAE-Cellulose, kombiniert mit einer Entsalzung über Sephadex G-75 durch. Die spezifische Aktivität des Enzyms stieg dabei im Durchschnitt auf das 200fache des Ausgangswertes an. Der Aktivitätsverlust in den 3 Schritten betrug 27% (nach Roder 32%) (12). Die Streubreite der Ergebnisse läßt sich durch den unterschiedlichen Reinheitsgrad der Fraktionen erklären. Je reiner das Ausgangsmaterial vorlag, desto geringer war der Verlust und eine desto größere Aktivitätsanreicherung wurde erzielt.

Eine entscheidende Vereinfachung der früheren Methoden brachte die Verwendung von Hydroxylapatit. Es bewährte sich die Cellulose MN 2 200 Apatit 50, die bei genügender Durchflußgeschwindigkeit von Substanz- und Pufferlösungen (Elutionsgeschwindigkeit: ca. 3,5 cm/h, Pufferdurchfluß: 30 ml/h) eine ausreichende Adsorptionskapazität für Proteine und Begleitstoffe besitzt. Die anzuwendende Pufferstärke, bei der überwiegend die Begleitproteine eluiert wurden, hing vom Reinheitsgrad des aufgezogenen Kallikreins ab. Je unreiner dieses war, bei desto geringerer Pufferstärke erfolgte seine Elution. Im Vorversuch mußte daher die jeweils günstigste Pufferkonzentration ermittelt werden. Je nach Reinheitsgrad mußte das salzhaltige Ausgangsmaterial 1 - 2 mal an Hydroxylapatit adsorbiert und chromatographiert werden. Die spezifische Aktivität konnte durch diesen Schritt allein um etwa 50% verbessert werden. Bei Verwendung chloroformgesättigter Pufferlösungen reichte die Kühlung der

Hydroxylapatit-Cellulose-Säulen mit Leitungswasser aus. Der mit hohen Verlusten verbundene elektrophoretische Reinigungsschritt des früheren Verfahrens (12) erübrigte sich dadurch. Während bei der Fraktionierung an DEAE-Cellulose der jeweils günstigste Anstieg des linearen Puffergradienten für die Reinigung des Materials ausschlaggebend war, erwies sich bei der Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose das Volumen der aufgetragenen Substanz als ein entscheidender Parameter. Die beste Reinigung wurde bei einem Volumen von 1 - 2% des Säuleninhalts erzielt.

Eine letzte Entsalzung und weitere Reinigung konnten mit der Fraktionierung an Sephadex G-50 erzielt werden. Stark eingengt und hochkonzentriert aufgezogen, zeigte sich ein einheitlicher Proteingipfel in der Elutionskurve der Säulenchromatographie (s. Abb. 5). Dies kann u.a. als ein Kriterium für die Homogenität des Enzympräparates gelten.

II. Isolierung und Reinigung von Harn-Kallikrein des Schweines

1. Frühere Methoden

Roder (12) ergänzte auch hier das Verfahren von Werle und Traut-schold (5), das eine dreifache Fällung des Urins mit Aceton und Gelfiltration über Sephadex G-75 bzw. G-100 beinhaltete, mit einer wiederholten Adsorption an DEAE-Cellulose, Protaminsulfat-

fällung, Säulenchromatographien an Sephadex G-75 und einer zweimaligen Auftrennung der Proteine durch Säulenelektrochromatographie. Die Gesamtausbeute war mit 4% der Ausgangsmenge sehr gering, die Aktivitätsanreicherung nicht optimal.

2. Unsere Methode (Tab.10)

Acetonfällungen und Fraktionierung an DEAE-Cellulose, kombiniert mit Gelfiltration, erwiesen sich als erfolgreiche Schritte mit einer hohen Ausbeute von 63% der Ausgangsmenge (nach Roder 49%) (12).

Die Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit aber erbrachte eine wesentliche Verbesserung der spezifischen Aktivität um etwa 50% bei einer guten Ausbeute von 52% der Ausgangsmenge. Die unreineren Fraktionen konnten durch Rechromatographie weiter gereinigt werden. Durch eine abschließende Entsalzung über Sephadex G-50 wurde eine Aktivitätsanreicherung um weitere 30% bei einer Gesamtausbeute von 43% (nach Roder 44) (12) erzielt. Eine bessere Reinigung dürfte mit der klassischen Methode nicht mehr möglich sein. Doch Isolierungsversuche unter Verwendung wasserunlöslicher Derivate des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors nach der von Fritz und Mitarbeitern entwickelten Methode (Adsorptionschromatographie über Trasylol-Harze) (73) versprechen einen weiteren Weg zur Gewinnung reiner Kallikrein-Präparate.

III. Charakterisierung des isolierten Submandibularis- und Harn-Kallikreins vom Schwein und Vergleich mit dem Pankreas-Kallikrein

1. Hemmung von Pankreas-, Submandibularis- und Harn-Kallikrein durch den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen

Anhand der Hemmkurven zeigt sich das unterschiedliche Verhalten des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen gegenüber den einzelnen Kallikreinen. Pankreas-Kallikrein wird von derselben Inhibitormenge etwas stärker als Submandibularis-Kallikrein, um das doppelte aber als Harn-Kallikrein inhibiert. Ein linearer Zusammenhang zwischen der verbleibenden Enzymaktivität und der eingesetzten Menge an Inhibitor läßt sich ablesen. Bei Harn-Kallikrein gilt die Linearität bis zu einem Hemmgrad von etwa 22%, während die Hemmkurven von Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein fast parallel zueinander bis zu einer Hemmung von 69,5 bzw. 63,8% der vorgelegten Enzyme linear verlaufen. Dies spricht für eine große Ähnlichkeit im Aufbau der Speicheldrüsen-Kallikreine, während Harn-Kallikrein vermutlich eine andere Struktur aufweist.

2. Hemmung von Pankreas-Kallikrein durch den Schweinesperma-Inhibitor

Die minimale Hemmung von $0,1 \mu\text{g}$ Kallikrein durch $0,5 \mu\text{g}$ SSI

zeigt, daß es sich hier wahrscheinlich um einen unspezifischen Hemmeffekt handelt, da, unter Berücksichtigung der Molekulargewichte bzw. der spezifischen Aktivität des Inhibitors und eines angenommenen 1 : 1 Inhibitor-Enzym-Komplexes, eine vollständige Hemmung von 0,1 μ g Kallikrein bereits bei 0,03 μ g SSI eintreten müßte.

3. Quantitative Bestimmung der BAPNA-spaltenden Aktivität von Pankreas-, Harn- und Submandibularis-Kallikrein

Im Gegensatz zu Trautscholds Veröffentlichung (5) greifen in unseren Versuchen die 3 Kallikreine das Substrat BAPNA an (s. C.IV.3.c). Doch während Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein in ähnliches Hemmverhalten zeigen, unterscheiden sie sich wesentlich hinsichtlich ihrer BAPNA-spaltenden Aktivität. Submandibularis-Kallikrein spaltet unter gleichen Bedingungen viermal soviel Substrat wie Pankreas-Kallikrein.

4. Vergleich der biologischen Aktivität von Kallikreinen aus Pankreas, Glandula submandibularis und Harn vom Schwein mit und ohne Inhibitor

a) Am Verlauf der Carotisdruckkurve nach i.v. Injektionen von Kallikreinen verschiedener Herkunft können wir wieder sowohl die Ähnlichkeit von Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein als auch eine gewisse Sonderstellung von Harn-Kallikrein fest-

stellen. Gleiche Mengen erstgenannter Enzyme verhalten sich in ihrer biologischen Aktivität wie 1 : 0,85, während Harn-Kallikrein den Blutdruck doppelt so stark wie Submandibularis-Kallikrein senkt.

b) Beim Vergleich der Blutdruckwirksamkeit durch gehemmte Kallikreine entspricht einer 50%igen Inaktivierung von Pankreas-Kallikrein durch eine gewisse Menge Trasylol eine 45 - 55%ige Inhibierung von Submandibularis-Kallikrein. Die Ähnlichkeit dieser Enzyme ist offensichtlich. Dagegen weist Harn-Kallikrein, mit gleicher Inhibitormenge versetzt, nur einen 13 - 25%igen Verlust seiner biologischen Aktivität auf. Die Streubreite der Ergebnisse erklärt sich durch die variierende Ansprechbarkeit des Hundekreislaufs auf die Injektionen. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen der Hemmkurve gut überein.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Einleitend wurde über das Vorkommen und über frühere Methoden zur Isolierung von Kallikreinen verschiedener Herkunft, sowie über das physikalische und biochemische Verhalten der Kallikreine nach Angaben der Literatur berichtet. Es wurden ferner die Pharmakologie der Kallikreine und die mögliche Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems in physiologischer und pathophysiologischer Hinsicht dargestellt.
2. In eigenen Untersuchungen wurden Kallikreine aus Submandibularis-Drüsen und Harn vom Schwein angereichert. Acetonfällung, Fraktionierung an DEAE-Cellulose, Entsalzung über Sephadex G-75, Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit-Cellulose und Fraktionierung an Sephadex G-50 erbrachten bei guter Ausbeute hohe spezifische Aktivitäten (s.Tab.6 und 10), die bei Submandibularis-Kallikrein einem Reinheitsgrad von 75 - 125 U/mg, bei Harn-Kallikrein einem Reinheitsgrad von 14,4 - 31,8 U/mg entsprachen.
3. Es wurde festgestellt, daß Pankreas-, Submandibularis- und Harn-Kallikreinemengen gleicher enzymatischer Wirkung gegenüber BALE durch gleiche Mengen des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen verschieden stark gehemmt wurden. Am stärksten gehemmt wurde Pankreas-Kallikrein, am schwächsten Harn-Kallikrein.

Diese Unterschiede ergaben sich auch bei der biologischen Auswertung der Inaktivierungsansätze am Blutdruck des nar- kotisierten Hundes.

4. Der Unterschied in der BAPNA-spaltenden Aktivität von Pankreas-, Harn- und Submandibularis-Kallikrein wurde erbracht. Deren Aktivität ist im Vergleich zu der durch Trypsin katalysierten Spaltung gering. Die BAPNA-Spaltung nahm von Pankreas- über Harn- zu Submandibularis-Kallikrein zu.
5. Anhand des optischen Tests (BAEE-Spaltung) wurde festgestellt, daß Pankreas-Kallikrein durch den Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Schweinesperma nicht gehemmt wird.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 H. Kraut, E. K. Frey, E. Werle, Z. physiol. Chem. 189, 97 (1930)
- 2 E. Werle, Biochem. Z. 290, 129 (1937)
- 2a E. Werle, biochem. Z. 289, 217 (1937)
- 3 M. M. Forell, W. Dobovicnik, L. Göldel, Z. ges. exp. Med. 132, 399 (1960)
- 4 G. Siebert, E. Werle, G. Jung, L. Maier, Biochem. Z. 326, 420 (1955)
- 5 I. Trautschold, Habilitationsschrift, Med. Fak. Univ. München (1965)
- 6 E. Habermann, Arch. exper. Path. Pharmacol. 241, 543 (1961)
- 7 E. Habermann, Z. physiol. Chem. 328, 15 (1962)
- 8 H. Fritz, I. Eckert, E. Werle, Z. physiol. Chem. 348, 1120 - 1132 (1967)
- 9 M. E. Webster, J. V. Pierce, J. Pharm. exp. Therap. 130, 484 (1960)
- 10 H. Kraut, E. K. Frey, E. Werle, F. Schultz, Z. physiol. Chem. 230, 259 (1934)
- 11 H. Kraut, I. Schweitzer, Z. physiol. Chem. 284, 211 (1949)
- 12 O. Roder, Dissertation, Med. Fak. Univ. München (1967)
- 13 E. Werle, P. von Roden, Biochem. Z. 286, 213 (1936)
- 14 E. K. Frey, H. Kraut, E. Werle: Das Kallikrein-kinin-System und seine Inhibitoren, Enke, Stuttgart (1968)
- 15 H. Moriya, K. Yamazaki, H. Fukushima, J. Biochem. Tokyo, 58 201 (1965)

- 16 T. Suzuki, S. Iwanaga, S. Nagasawa, T. Sato in: E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, Springer, New York (1966)
- 17 E. Werle, R. Vogel, G. Kaliampetsos: II. Weltkongress für Gastroenterologie, München 1962, Karger, Basel; II, S. 778
- 18 E. Werle, M. M. Forell, L. Maier, Arch. exper. Path. Pharmacol. 225, 369 (1955)
- 19 R. Vogel, G. Rüdel, L. von Ziegesar, Arzneimittelforschung 12, 881 (1962)
- 20 E. Werle, Biochem. Z. 290, 129 (1937)
- 21 E. Werle, L. Maier, Klin. Wschr. 33, 1103 (1955)
- 22 E. Werle, R. Vogel, Arch. int. Pharmacodyn. 131, 257 (1961)
- 23 L. F. Chapman, A. O. Ramos, H. Goodell, G. Silvermann, H. G. Wolff, Trans. Amer. Neurol. Ass. 85, 42, 200 (1960)
- 24 K. D. Bhoola, R. M. M. Yi, J. Morley, M. Schachter, J. physiol. 159, 34P (1961)
- 25 E. Werle, J. Däumer, Biochem. Z. 304, 377 (1940)
- 26 E. K. Frey, H. Kraut, E. Werle, Kallikrein (Padutin) F. Enke, Stuttgart (1950)
- 27 I. Trautschold, H. Fritz, E. Werle in: E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, Springer, New York (1966)
- 28 E. Werle, I. Trautschold, G. Leysath, Z. physiol. Chem. 326, 174 (1961)
- 29 F. Fiedler, B. Müller, E. Werle, Z. physiol. Chem. 351, 1002 - 1006 (1970)
- 30 H. Moriya, Chemical Studies on Callicrein, Yakagaku Zasshi 79, 1390 (1959)
- 31 E. Habermann, G. Rosenbusch, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 243, 357 (1962)
- 32 E. Werle, B. Kaufmann-Boetsch, Z. physiol. Chem. 319, 52 (1960)

- 33 N. E. Webster, J. V. Pierce, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 107, 186 (1961)
- 34 E. Habermann, Arch. exp. Path. Pharmacol. 245, 230 (1963)
- 35 C. W. Aungst, N. Back, B. Barlow, G. A. Tsukada in: E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, Springer New York, (1966)
- 36 E. Werle, K. Urhahn, Biochem. Z. 304, 387 (1940)
- 37 M. E. Webster: Arthritis Rheumatism. 9, 473 (1966)
- 38 K. Saameli, T. Eskes, Fed. Proc. 21, 400 (1962)
- 39 W. Lochner, J. R. Parrat, Brit. J. Pharmacol. 26, 17 (1966)
- 40 E. Schröder, R. Hempel, Experientia 20, 529 (1964)
- 41 E. Werle, G. Mulhaupt, Münch. Med. Wschr. 79, 407 (1937)
- 42 A. Lindemann: Leitfaden der Chirurgie und Orthopädie der Kiefer und des Mundes, Lieferung 5. Barth, Leipzig (1947)
- 43 E. K. Frey, H. Kraut, Arch. exper. Path. Pharmacol. 133, 1 (1928)
- 44 E. K. Frey, E. Werle, E. Sackers, Z. ges. exp. Med. 96, 404 (1935)
- 45 J. Carr, D. L. Wilhelm, Nature 208, 653 (1965)
- 46 G. P. Lewis, Metabolism 13, 1256 (1964)
- 47 K. Türker, B. K. Kiron, S. Kaymakçalan, Arch. int. Pharmacodyn. 151 (1964)
- 48 E. Moog, I. Fischer, Arch. exp. Path. Pharmacol. 249, 384 (1964)
- 49 E. Werle, Klin. Wschr. 15, 848 (1936)
- 50 D. Armstrong, J. B. Jepson, C. A. Keele, J. W. Stewart, J. physiol. 135, 350 (1957)
- 51 P. Periti, F. Gasparri in: E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, Springer, New York (1966)

- 52 E. Werle, R. Vogel, G. Rüdcl, Arch. int. Pharmacodyn. 149, 119 (1964)
- 53 E. Werle, H. Pichlmaier, R. Pichlmayr, A. Schmal, unver-
öffentl.
- 54 R. Vogel, G. Rüdcl, L. von Ziegesar, Arzneimittelforsch. 12, 881 (1962)
- 55 R. Vogel, L. F. Göldcl, M. Hutzel, Arzneimittelforsch. 12, 885 (1962)
- 56 S. M. Hilton in: M. Schachter: Polypeptides, which affect
Smooth Muscles and Blood Vessels, Pergamon Press (1960)
- 57 D. C. Kroeger, W. Krivoy in: E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, Springer, New York (1966)
- 58 S. M. Hilton in: E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri: Hypo-
tensive Peptides, Springer, New York (1966)
- 59 I. Trautschold, G. Rüdcl, Klin. Wschr. 41, 297 (1963)
- 60 I. Trautschold, E. Werle, Z. physiol. Chem. 325, 48 (1961)
- 61 V. Becker, Sekretionsstudien am Pankreas, G. Thieme, Stutt-
gart (1957)
- 62 E. Werle, I. Trautschold, G. Zickgraf-Rüdcl, Arzneimittel-
forsch. 16, 1507 (1966)
- 63 G. P. Lewis, Ann. N. Y. Acad. Sci. 104 (1963)
- 64 K. L. Mlmon, M. J. Cline: IIIrd International Pharmacologi-
cal Congress, Sao Paulo 1966, Abstracts
- 65 M. Frinner, Dtsch. med. Wschr. 91, 33 (1966)
- 66 E. G. Erdös, Advanc. Pharmacol. 4, 1 (1966)
- 67 E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri, Hypotensive Peptides,
Springer, New York (1966)
- 68 E. Werle: Symposium in Grosse Ledder 1965, F. K. Schattauer,
Stuttgart (1966)
- 69 M. E. Webster, W. R. Clark, Am. J. Physiol. 197, 406 (1959)

- 70 F. Sicuteri, P. L. Del Bianco, M. Fanciullacci in: E. G. Erdős, N. Back, F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, Springer, New York (1966)
- 71 E. Werle, I. Trautschold, H. Schievelbein, Klin. Wschr. 44, 656 (1966)
- 72 E. Werle, Dtsch. Med. Wschr. 35, 1573 - 1580 (1967)
- 73 H. Fritz, B. Brey, A. Schmal, E. Werle, Z. physiol. Chem. 350, 617 - 625 (1969)
- 74 I. Trautschold, H. Fritz, H. Haendle, E. Werle, Vortrag: New York Academy of Science, Symposium on "Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications of Proteinase-Inhibitors", New York 1966
- 75 R. Vogel, I. Trautschold, E. Werle: Natürliche Proteinasen-Inhibitoren, G. Thieme, Stuttgart (1966)
- 76 E. Werle, B. Kaufmann-Boetsch, Z. physiol. Chem. 319, 52 (1960)
- 77 I. Trautschold, H. Fritz, E. Werle in: G. Kroneberg, R. Gross: Neue Aspekte der Trasyolol-Therapie, F. K. Schattauer, Stuttgart 1966, S.3
- 78 E. Werle, I. Trautschold in: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Auflage Bd. VI/C, 1966
- 79 F. Fiedler, E. Werle, Z. physiol. Chem. 348, 1087 - 1089 (1967)
- 80 T. E. Weichselbaum, Americ. J. clin. Pathol. 10, 40 (1946)
- 81 H. Fritz, G. Hartwich, E. Werle, Z. physiol. Cnem. 345, 50 (1966)
- 82 H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle in: H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Weinheim (1970)
- 83 G. Müller-Bardorff, Dissertation, Med. Fak. Univ. München (1971)
- 84 H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle in: Hypotensive Peptides, Proceedings of the Int. Symposium Oct. 25 - 30, 1965, Florence, von E. G. Erdős, N. Back, F. Sicuteri, p. 221, Springer, New York (1966)

- 85 E. Bauer, E. K. Frey, H. Kraut, F. Schultz, E. Werle, Naturwiss. 17, 672 (1929)
- 86 H. Kraut, E. K. Frey, E. Werle, Z. physiol. Chem. 192, 1 (1930)
- 87 F. Fiedler, Ch. Hirschauer, E. Werle, Z. physiol. Chem. 351, 225 - 238 (1970)
- 88 H. Fritz, K. Hochstraßer, E. Werle, Z. für analyt. Chem. 243, 452 (1968)
- 89 E. Werle in: O. Eichler, A. Farah, H. Herken, A. D. Welch: Handbook of Experimental Pharmacology, Springer, New York (1970)
- 90 J. V. Pierce in: O. Eichler, A. Farah, H. Herken, A. D. Welch: Handbook of Experimental Pharmacology, Springer, New York (1970)

Für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle und Herrn Priv. Doz. Dr. H. Fritz meinen besten Dank aussprechen.

Ebenso bedanke ich mich bei Fräulein Brey für die freundliche Hilfe beim praktischen Teil der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 14. Mai 1946 wurde ich, Edeltraud Franziska Müller, als zweite Tochter des kaufmännischen Angestellten Josef Müller und seiner Gattin Franziska, geb. Haimerl, in Eggenfelden geboren.

1952 trat ich in die Volksschule in Vilsbiburg ein und wechselte 1957 auf das Realgymnasium Seligenthal in Landshut über. Im Oktober 1958 setzte ich meine Schulzeit am mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium in Mühldorf fort. Im Juni 1966 legte ich an dieser Schule das Abitur ab.

Seit November 1966 studierte ich an der Universität München Humanmedizin, legte im März 1969 die ärztliche Vorprüfung ab und bestand im Dezember 1972 das Staatsexamen mit "sehr gut".

Während meiner Medizinalassistentenzeit arbeite ich in Kliniken der Universität München.

